

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE DE RECHERCHE PRÉSENTÉ À  
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE ET EN BIOLOGIE CELLULAIRES

PAR

LUC MORIN, B. Sc. (Mathématiques)

ACTION DES ANIONS SULFATE ET SULFITE  
DANS LA PHASE LUMINEUSE DE LA PHOTOSYNTHÈSE

AOUT 2003

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

## REMERCIEMENTS

Je tiens avant tout à remercier très chaleureusement Robert Carpentier, mon directeur de recherche. Merci de m'avoir guidé, merci de vos encouragements et de votre bonne humeur constante lors de nos rencontres. La patience démontrée à mon égard a été grandement appréciée. J'ai grandi en votre présence.

Des remerciements tout aussi chaleureux s'adressent à mon co-directeur, Radovan Popovic, pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire et pour ses bons conseils. Merci aussi pour toutes ces longues discussions que nous avons eues dans votre bureau sur la photosynthèse et sur bien d'autres sujets.

Des remerciements spéciaux à Mme Margot Tourigny, secrétaire au département de Chimie-biologie de l'université pour ses précieux courriels et appels contenant l'information tant désirée.

Merci à Jean Pascal pour m'avoir montré, il y a belle lurette, une bicouche lipidique. Merci à tous ceux et celles qui m'ont aidé plus ou moins directement tout au long de ces études et dont j'aurais oublié de mentionner leur nom dans cette page.

Enfin, je tiens à remercier les membres du jury : Robert Carpentier, Guy Samson et Marc Beauregard qui ont accepté de juger ce mémoire.

## RÉSUMÉ

Des études intensives ont été réalisées sur les effets du  $\text{SO}_2$  sur le processus physiologique des plantes. Les réactions lumineuses de la photosynthèse sont connues comme étant une cible sensible de l'effet inhibiteur du  $\text{SO}_2$ . Le  $\text{SO}_2$  absorbé par les plantes est converti en anions bisulfite, sulfite, et sulfate dans les cellules végétales. Il est connu que l'anion sulfate s'accumule dans le cytosole de la plante. Quelques expériences démontrent qu'après fumigation au  $\text{SO}_2$ , le sulfate est difficilement éliminé des cellules. L'accumulation de sulfate dans la cellule devrait amener la présence de sulfate dans les chloroplastes. Bien que le sulfate interfère avec l'activité du chloroplaste, le site de son action dans la membrane du chloroplaste n'est pas précisément identifié.

Cette étude porte sur les effets des anions sulfate et sulfite dans la phase lumineuse de la photosynthèse. Notre objectif de recherche concernait la reconnaissance des effets de ces anions sur la structure et la fonction de l'appareil photosynthétique.

Nous avons utilisé des membranes de thylacoïde et des membranes enrichies en photosystème II pour réaliser cette étude. Trois aspects ont été considérés. À savoir : l'aspect fonctionnel (activité en émission d'oxygène), l'aspect structurel (composition en protéines du photosystème II), et l'aspect énergétique (désactivation thermique des pigments de l'antenne chlorophyllienne).

L'activité des membranes de thylacoïde et des membranes enrichies en photosystème II a été mesurée à l'aide d'une électrode de type Clark ; cette activité a été mesurée sur des échantillons contrôles et des échantillons traités. La composition en protéines des membranes enrichies en photosystème II a été étudiée à l'aide de la technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide; cette composition a été déterminée sur des échantillons contrôles et des échantillons traités. Enfin, lors de l'étude sur les effets de l'anion sulfate, les membranes de thylacoïde et les membranes enrichies en photosystème II ont été incorporées dans un film d'alcool de polyvinyle afin de les stabiliser et de prendre divers spectres à l'aide du même échantillon. L'aspect énergétique a pu ainsi être investigué.

Les observations obtenues à partir des mesures prises en dégagement d'oxygène montrent que le sulfate inhibe l'activité des membranes. La présence de lumière pendant les traitements stimule

cette inhibition. Cependant, la présence de chlorure de calcium pendant les traitements à la noirceur a permis de protéger cette inhibition. En présence de lumière la protection n'est que partielle. À partir d'une certaine concentration en sulfate ( $\geq 10$  mM) des dommages structurels apparents sont observés au niveau du complexe d'émission d'oxygène. Ce même complexe est également touché par le sulfite et nos résultats nous fournissent des informations sur la nature du lien entre le polypeptide de 33 kDa et le complexe du PSII ; à savoir : la présence de force électrostatique et de ponts hydrogène. Les valeurs de désactivation thermique des membranes traitées au sulfate nous montrent aussi que le mode de désexcitation des pigments était perturbé et que nous pouvions relier ceci, à tout le moins, à une altération du transfert d'énergie d'excitation entre les pigments. Une grande quantité de l'énergie absorbée n'atteint pas les centres réactionnels. Le sulfate influence aussi l'organisation des caroténoïdes et la distribution de l'énergie d'excitation entre le PS II et le PS I.

# TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	i
RÉSUMÉ.....	ii
TABLE DES MATIÈRES.....	iv
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS.....	xi
 CHAPITRE I      INTRODUCTION .....	 1
1.1    La photosynthèse .....	1
1.1.1    La phase lumineuse .....	2
1.1.2    La phase obscure .....	4
1.2    Le chlorolaste .....	4
1.2.1    Le stroma .....	7
1.2.2    Les grana et les lamelles intergranaires .....	7
1.3    Les thylacoïdes .....	9
1.3.1    La chaîne de transfert des électrons .....	9
1.3.2    Aspects fonctionnel et structurel .....	12
1.4    Le photosystème II .....	13
1.4.1    Sa fonction .....	13
1.4.2    Le transfert des électrons chez le PS II .....	13
1.4.3    Sa structure .....	16

1.5	Le complexe d'émission d'oxygène .....	19
1.5.1	Les atomes de manganèse .....	22
1.5.2	Les ions chlorure (Cl <sup>-</sup> ) et calcium (Ca <sup>2+</sup> ) .....	22
1.5.3	Les polypeptides extrinsèques .....	23
1.6	Les collecteurs de lumière .....	25
1.7	Le but du travail .....	27
<b>CHAPITRE II</b>	<b>MATÉRIELS ET MÉTHODES .....</b>	<b>28</b>
2.1	Préparation des échantillons .....	28
2.1.1	Les thylacoïdes .....	28
2.1.2	Les membranes enrichies en PS II .....	31
2.2	Détermination de la concentration en chlorophylle des échantillons .....	33
2.3	Mesures en émission d'oxygène des échantillons – La polarographie.....	34
2.3.1	L'électrode de type CLARK .....	34
2.3.2	Calibrer l'électrode .....	35
2.4	Composition en protéines des échantillons – Technique d'électrophorèse .....	36
2.4.1	La technique « SDS-PAGE » .....	38
2.5	Préparation des milieux isotrope et anisotrope .....	40
2.5.1	Milieu isotrope .....	40
2.5.2	Milieu anisotrope .....	41
2.6	La spectroscopie .....	43
2.6.1	Spectres d'absorption .....	43
2.6.2	Spectres d'émission de fluorescence .....	43
2.6.3	Spectres photoacoustiques .....	43

2.6.4	Principe de base de la spectroscopie photoacoustique .....	45
2.6.5	La désactivation thermique .....	47
2.7	Traitement des thylacoïdes et des PS II .....	48
2.7.1	Traitement au sulfite .....	48
2.7.2	Traitement au sulfate .....	48
<b>CHAPITRE III</b>	<b>EXTRACTION DES PROTÉINES EXTRINSÈQUES DE 33, 23 ET 18 kDA DU PHOTOSYSTÈME II PAR TRAITEMENT AU SULFITE À UN pH ALCALIN .....</b>	<b>50</b>
3.1	Résumé .....	50
3.2	Introduction .....	51
3.3	Résultats et discussion .....	52
<b>CHAPITRE IV</b>	<b>INHIBITION AU SULFATE DU COMPLEXE D'ÉMISSION D'OXYGÈNE DU PHOTOSYSTÈME II .....</b>	<b>56</b>
4.1	Résumé .....	56
4.2	Introduction .....	57
4.3	Résultats .....	58
4.4	Discussion .....	65
4.5	Conclusion .....	66
<b>CHAPITRE V</b>	<b>INFLUENCE DU SULFATE SUR LES SPECTRES POLARISÉS DES THYLACOÏDES .....</b>	<b>67</b>
5.1	Résumé .....	67
5.2	Introduction .....	68
5.3	Résultats et discussion .....	69
5.4	Conclusion .....	76



<b>CHAPITE VI</b>	<b>CONCLUSION .....</b>	<b>77</b>
<b>CHAPITRE VII</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>78</b>

## LISTE DES TABLEAUX

2.1	Composition chimique des solutions utilisées lors de l'extraction des membranes de thylacoïde .....	30
2.2	Composition chimique des solutions utilisées lors de l'extraction des membranes enrichies en PS II .....	32
2.3	Composition chimique des solutions utilisées lors de la séparation des protéines par électrophorèse .....	37
2.4	Composition chimique des solutions utilisées lors des traitements des PSII au sulfite ou lors des contrôles .....	49
4.1	Effet de l'incubation au sulfate sur les protéines de 23 et 18 kDa .....	63
5.1	Désactivation thermique (TD) de thylacoïdes (TH) dans des films non étirés (u) et étirés (s), n – lumière naturelle .....	74

## LISTE DES FIGURES

1.1	La phase lumineuse .....	3
1.2	La phase obscure .....	5
1.3	Le chloroplaste .....	6
1.4	Vue tridimensionnelle du système membranaire contenu à l'intérieur du chloroplaste .....	8
1.5	La chaîne de transfert des électrons dans le thylacoïde .....	10
1.6	Le transfert des électrons chez le PS II .....	15
1.7	Modèle du photosystème II .....	18
1.8	Cycle d'oxydation de l'eau .....	21
2.1	Structure chimique du gel de polyacrylamide .....	39
2.2	L'appareil à étirement du film de PVA .....	42
2.3	Géométrie de la mesure d'émission de fluorescence polarisée .....	44
2.4	Schéma du spectromètre photoacoustique et de la cellule .....	46
3.1	Effet de l'incubation au sulfite à un pH de 8.0 des complexes du PS II .....	53
3.2	Effet du traitement au sulfite à un pH de 9.8 sur les PSII .....	54
4.1	Inhibition au sulfate des particules de PS II .....	59
4.2	Effet de la lumière sur l'inhibition au sulfate de l'émission d'oxygène des PS II .....	60
4.3	Perte en polypeptides dans le complexe du PS II par incubation des particules de PSII en présence de sulfate. ....	62
4.4	Comparaison de la perte en polypeptides avec l'inhibition de l'émission d'oxygène par les particules de PSII .....	64
5.1	Spectres d'absorption des thylacoïdes incorporés dans des films de PVA .....	70
5.2	Spectres photoacoustiques de thylacoïdes dans des films de PVA .....	71

5.3	Spectres de fluorescence (A, B) et de fluorescence polarisée (C, D) de thylacoïdes incorporés dans un film de PVA non étiré (A) ou étiré (B, C, D) sous diverses longueurs d'onde d'excitation (436 nm à 530 nm du haut vers le bas) .....	75
-----	--	----

## LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES SYMBOLES

A <sub>663</sub>	Absorbance à 663 nm.
A <sub>645</sub>	Absorbance à 645 nm.
ADP	Adénosine diphosphate
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribo nucléique
ATP	Adénosine triphosphate
CaCl <sub>2</sub>	Chlorure de calcium
Ca <sup>+2</sup>	Ion calcium
Chl	Chlorophylle
Cl <sup>-</sup>	Ion chlorure
CPO	Complexe producteur d'oxygène
CP-43	Complexe chlorophylle-protéine du photosystème II
CP-47	Complexe chlorophylle-protéine du photosystème II
DCBQ	2,5-dichlorobenzoquinone
DGDG	Digalactosyldiglycéride
D1	Polypeptide du photosystème II
D2	Polypeptide du photosystème II
FeCN	Ferricyanure
Hepes	Acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N'-2-éthanesulfonique
LHCII	Antenne chlorophyllienne
Mes	2(N-Morpholino)ethanesulfonic acid

MGDG	Monogalactosyldiglycérider
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
PC	Plastocyanine
PG	Phosphatidylglycérol
Phéo	Accepteur primaire d'électrons du photosystème II
Pi	Phosphate inorganique
PS I	Photosystème I
PS II	Photosystème II
PQ	Plastoquinone
PQH <sub>2</sub>	Plastohydroquinone
PVA	Alcool de polyvinyle
P-680	« Paire spéciale » de molécules de chlorophylle du centre réactionnel du photosystème II
P-700	« Paire spéciale » de molécules de chlorophylle du centre réactionnel du photosystème I
Q <sub>A</sub>	Accepteur secondaire d'électrons du photosystème II
Q <sub>B</sub>	Accepteur tertiaire d'électrons du photosystème II
Q <sub>B</sub> H <sub>2</sub>	Plastohydroquinone
SDS-PAGE	« Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis »
SQDG	Sulfoquinovosyldiacylglycérol
So à S <sub>4</sub>	États de distribution de charges au sein du complexe producteur d'oxygène
Temed	N,N,N',N'-tétraméthyl-éthylène diamine
Z	Donneur secondaire d'électron du photosystème II

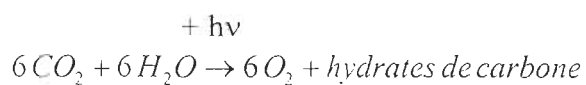
# CHAPITRE 1

## INTRODUCTION

### 1.1 LA PHOTOSYNTHESE

Les êtres vivants sur Terre ont besoin d'un apport d'énergie pour assurer leur survie<sup>1</sup> (14). Les hydrates de carbone que nous consommons dans notre alimentation quotidienne fournissent cet apport d'énergie qui nous est vitale. Nous les retrouvons directement dans certains aliments (céréales de blé, le maïs, etc) ou indirectement dans d'autres (œufs, viândes, etc.). Ces hydrates de carbone sont synthétisés dans la nature par les plantes vertes via un processus complexe connu sous le nom de photosynthèse.

La réaction globale associée à cette synthèse est :



(1)

<sup>1</sup> « préserver l'ordre »

Dans cette réaction, les plantes vertes utilisent l'eau ( $H_2O$ ) et le gaz carbonique ( $CO_2$ ) contenu dans l'atmosphère pour former des hydrates de carbone et rejeter de l'oxygène ( $O_2$ ). Cette réaction est thermodynamiquement défavorable. Pour avoir lieu, le système doit être suppléé en énergie. La forme d'énergie utilisée est l'énergie lumineuse fournie par notre étoile, le Soleil.

Les diverses réactions intervenant dans le processus photosynthétique se divisent selon deux phases. La phase lumineuse et la phase obscure.

### 1.1.1. La phase lumineuse

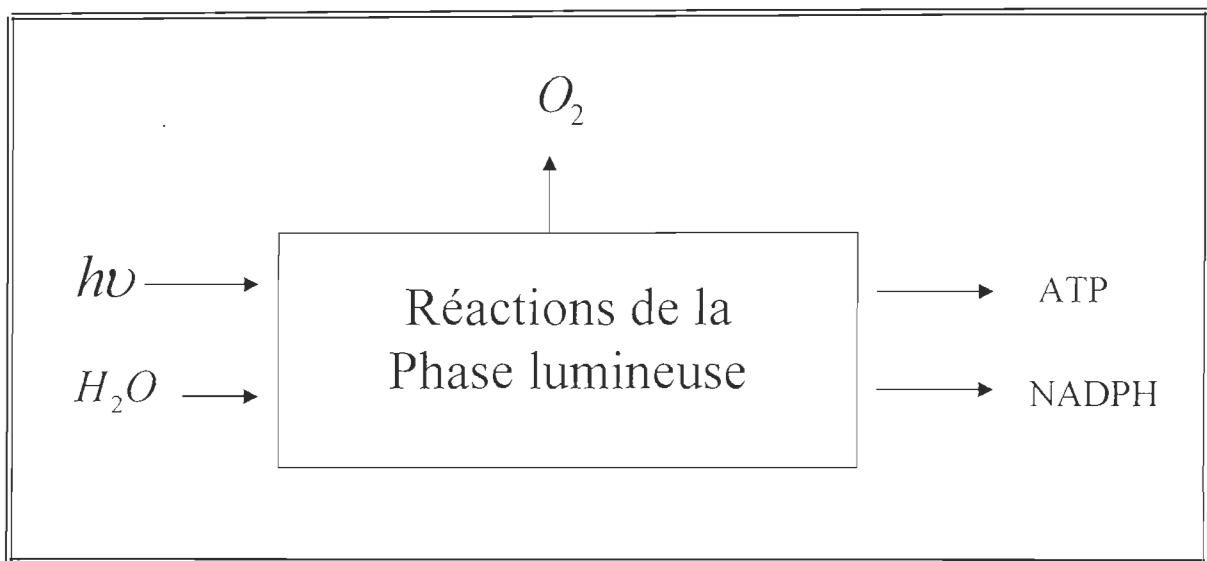
C'est durant cette phase que les réactions photochimiques ont lieu<sup>2</sup>. C'est-à-dire que des photons de lumière sont captés et piégés. Cette énergie servira à arracher des électrons à des molécules d'eau (dissociation de l'eau) et à promouvoir leur transfert vers un site permettant la réduction du composé  $NADP^+$  en NADPH. Le NADPH est utilisé lors de la phase obscure. Des complexes protéiniques et des transporteurs d'électrons mobiles sont associés à cette phase lumineuse.

Lors de ce transfert d'électrons, un gradient de protons est généré où viennent participer les protons de la dissociation de l'eau et d'autres protons dont la source sera définie un peu plus loin dans le texte. Ce gradient servira à synthétiser de l'ATP, un composé dont l'énergie sera utilisée dans la phase obscure. La dissociation des molécules d'eau, en plus de fournir des électrons et des protons, produit de l'oxygène moléculaire qui est rejeté dans l'atmosphère.

En résumé, dans la phase lumineuse, de l'énergie électromagnétique et des molécules d'eau sont utilisées dans la formation des produits : ATP et NADPH ; de l'oxygène moléculaire est de plus émise (figure 1.1).

<sup>2</sup> Réactions ayant besoin de lumière d'où son nom de phase lumineuse.





**FIGURE 1.1 :** La phase lumineuse

### 1.1.2. La phase obscure

Au cours de la phase obscure<sup>3</sup>, les composés ATP et NADPH sont utilisés dans un cycle (le cycle de Calvin). Ce cycle fixe le  $CO_2$  et produit les hydrates de carbone (figure 1.2).

Le processus de la photosynthèse a lieu dans les plantes vertes au sein d'organites cellulaires nommés chloroplastes.

## 1.2 LE CHLOROPLASTE

Le chloroplaste, figure 1.3 (15), est un organe cellulaire. Nous le retrouvons en nombre variable à l'intérieur de la cellule, de quelques dizaines (feuille de laitue) à plus d'une centaine (feuille d'épinard). Ils occupent environ 20% du volume cellulaire. Notons qu'il existe une corrélation négative entre le volume des chloroplastes et leur nombre dans la cellule (16-17).

Chaque chloroplaste est limité par une enveloppe. Cette enveloppe est constituée par une double membrane<sup>4</sup>, externe et interne, renfermant l'espace intermembranaire. Leur fonction diffère. La membrane externe est très perméable. Elle laisse passer librement un grand nombre d'éléments tandis que la membrane interne est hautement sélective (17). Chacune de ces membranes est une bicouche lipidique d'environ 10 nm d'épaisseur et constituée principalement de DGDG et PC (17). La distance qui les sépare (l'espace intermembranaire) est inférieure à 20 nm (16-17). La membrane externe fait face au cytoplasme alors que la membrane interne renferme une matrice visqueuse non structurée (le stroma) et un système membranaire (les thylacoïdes).

<sup>3</sup> Nommée ainsi parce que la formation d'hydrates de carbone peut avoir lieu en absence de lumière. La plante utilisant alors ses réserves d'ATP et de NADPH produites lors de la phase lumineuse.

<sup>4</sup> Les chloroplastes et les mitochondries sont les seuls organites cellulaires à posséder une double membrane.

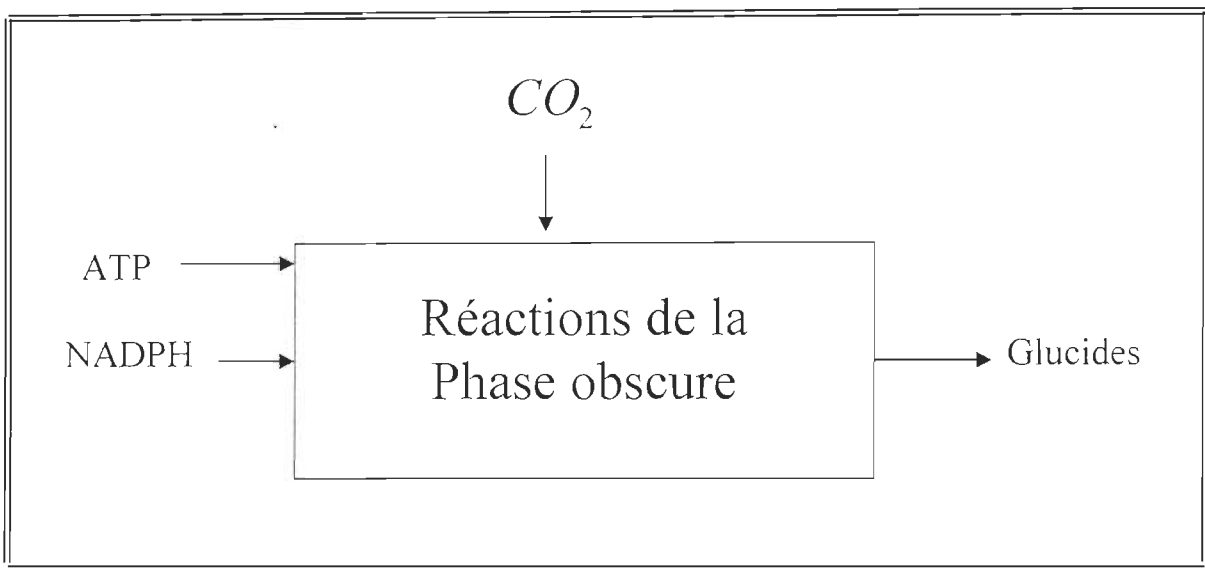
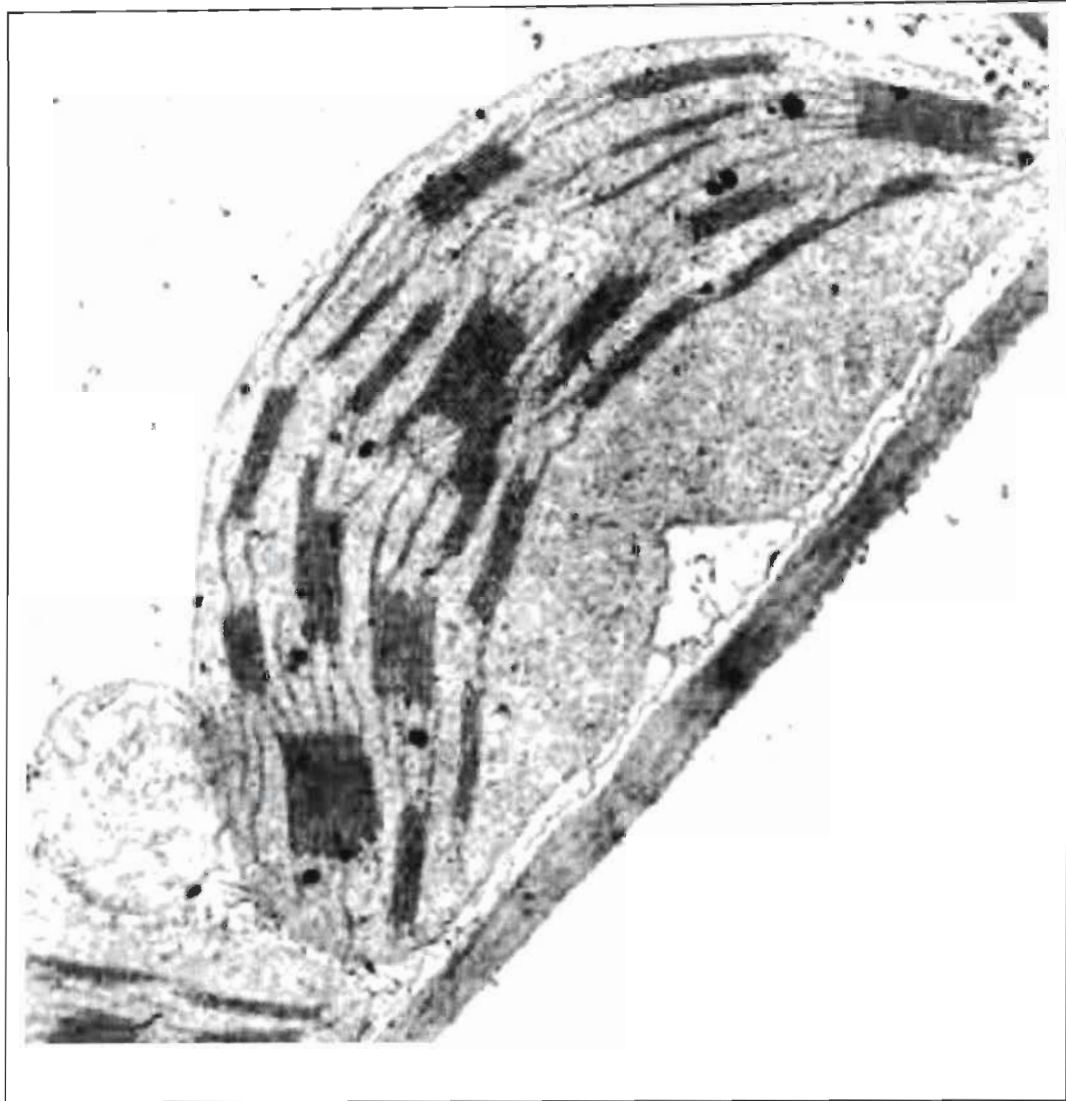


FIGURE 1.2 : La phase obscure



**FIGURE 1.3 :** Le chloroplaste (tiré de la réf. 15)

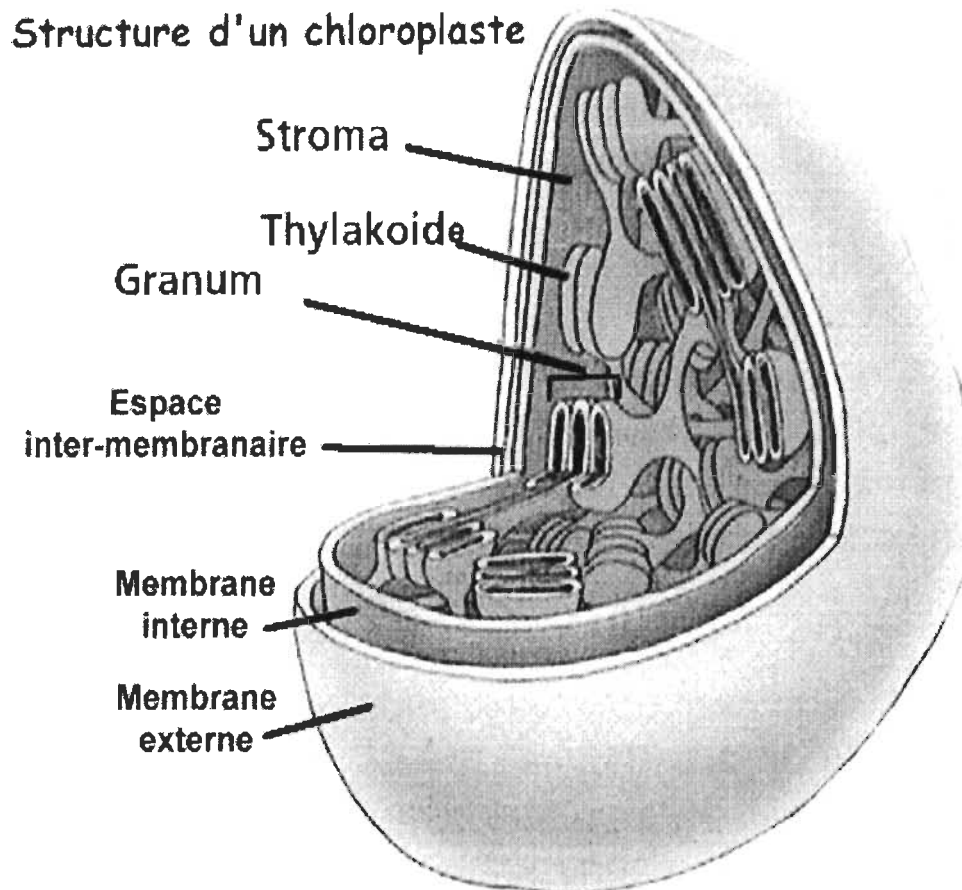
Nous retrouvons dans la membrane interne, des systèmes enzymatiques appelés translocateurs qui assurent le passage des éléments de part et d'autre de la membrane (17).

### **1.2.1 Le stroma**

Le stroma est la matrice visqueuse non structurée contenue par la membrane interne du chloroplaste. C'est là que se déroulent les étapes « chimiques » de la photosynthèse (fixation du  $CO_2$ , formation d'amidon...). Nous retrouvons dans le stroma les enzymes et cofacteurs nécessaires au cycle de Calvin, de l'ADN, de l'ARN, des ribosomes, des grains d'amidon, et des molécules d'ADP,  $NADP^+$ ,  $P_i$ , etc. Tout ce bagage fait du chloroplaste une unité relativement indépendante au sein de la cellule.

### **1.2.2 Les grana et les lamelles intergranaires**

Le système membranaire baignant dans le stroma du chloroplaste se présente sous forme de grana (empilements de membranes) et de lamelles intergranaires, figure 1.4 (18). Le nombre de ces empilements peut être de plusieurs dizaines dans un chloroplaste. Chaque pile est traversée par une ou plusieurs lamelles intergranaires. Ces membranes intrachloroplastiques ont une surface totale qui dépasse de plusieurs dizaines de fois la surface de l'enveloppe du chloroplaste (17). Quoique ces membranes présentent des différenciations organisationnelles (granum et lamelle intergranaire), nous les nommons toutes les deux thylacoïdes.



**FIGURE 1.4 :** Vue tridimensionnelle du système membranaire contenu à l'intérieur du chloroplaste.

(tirée de la réf. 18)

### 1.3 LES THYLACOÏDES

La membrane du thylacoïde est une bicouche lipidique dans laquelle s'insèrent des complexes protéiques. C'est dans ces membranes qu'a lieu la phase lumineuse, c'est-à-dire les réactions photochimiques amenant subséquemment la formation de NADPH et d'ATP (19-20).

La fraction lipidique de la membrane du thylacoïde est constituée principalement au  $\frac{3}{4}$  de galactolipides neutres (MGDG et DGDG), de  $\frac{1}{5}$  de lipides chargés négativement (PG et SQDG) et d'environ 5% de phospholipides (21).

La fraction protéinique de la membrane du thylacoïde n'est pas simple. Elle est constituée de protéines extrinsèques et intrinsèques. Ces diverses protéines forment au moins quatre complexes protéiniques au sein de ces membranes, le photosystème I (PSI) et le photosystème II (PSII), le complexe cytochrome  $b_6-f$ , et le facteur de couplage (22).

Les complexes protéiniques font partie d'une chaîne de transfert d'électrons, à l'exception du facteur de couplage. Ce dernier profite néanmoins du gradient de protons généré par le transport des électrons le long de cette chaîne pour former de l'ATP.

#### 1.3.1. La chaîne de transfert des électrons

La chaîne de transfert des électrons, figure 1.5 (23) est constituée des photosystèmes I et II (PSI et PSII), du complexe cytochrome  $b_6-f$  (cyt  $b_6-f$ ), et de transporteurs d'électrons intersystèmes (PQ, PC).

Le photosystème II, situé du côté oxydant de la chaîne, catalyse à l'aide de l'énergie lumineuse le transfert des électrons de l'eau au premier transporteur d'électrons intersystème mobile, à savoir la plastoquinone (PQ) (24).

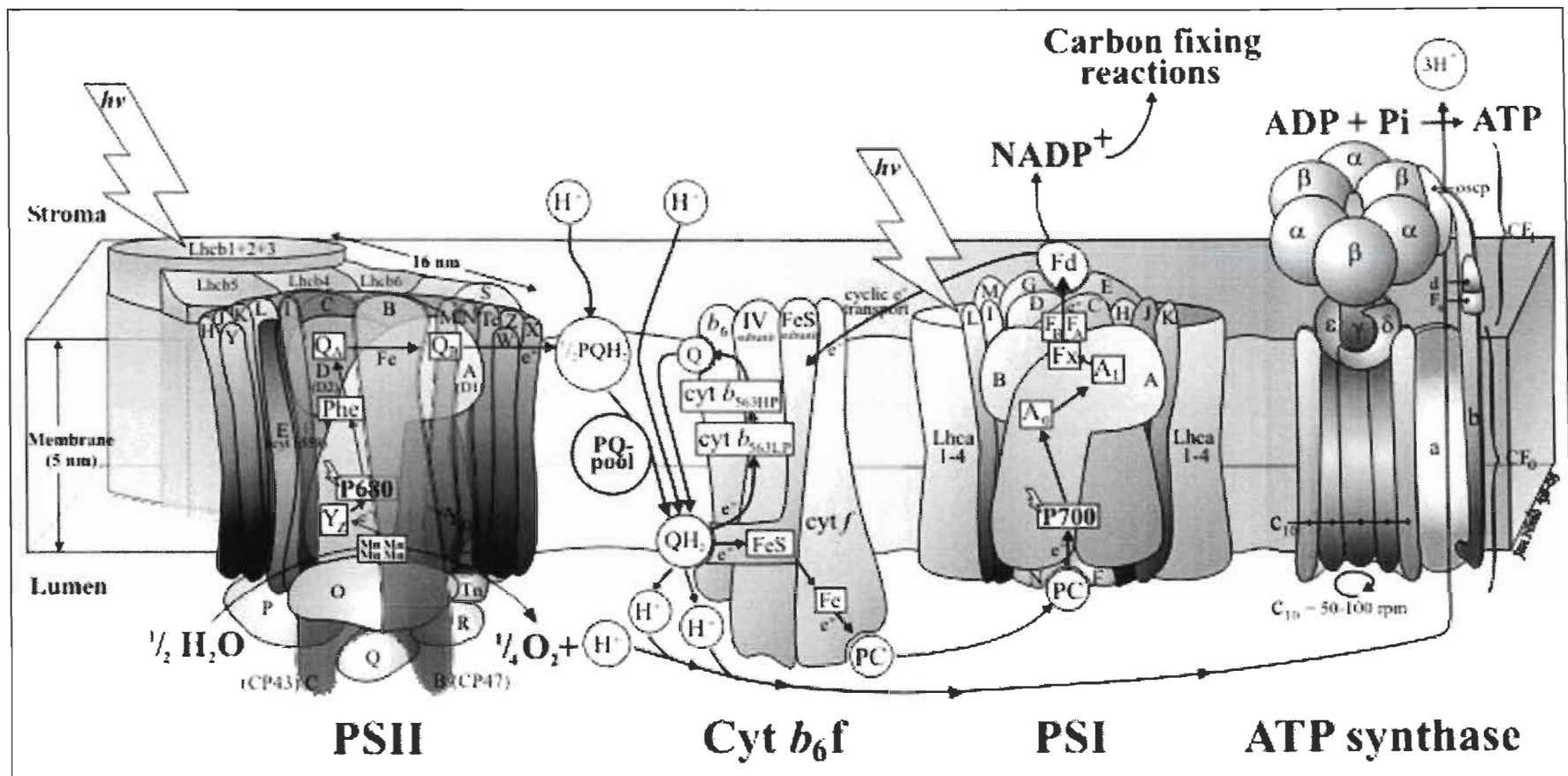


FIGURE 1.5 : La chaîne de transfert des électrons

dans la membrane du thylacoïde

(tirée de la réf. 23)



La plastoquinone accepte deux électrons du photosystème II suite à deux cycles de transfert d'électrons au sein de celui-ci. Lorsque la plastoquinone est doublement réduite, nous obtenons par protonation une plastohydroquinone ( $PQH_2$ ) (21).

La plastohydroquinone diffuse vers la face interne de la membrane du thylacoïde. Elle largue ces deux protons dans le lumen du thylacoïde et donne ces deux électrons au complexe cytochrome  $b_6-f$ . Ce complexe est situé entre le photosystème II et le photosystème I. La plastohydroquinone redevient une plastoquinone qui peut de nouveau diffuser vers le photosystème II pour accepter deux autres électrons.

Les électrons progressent dans le complexe cytochrome  $b_6-f$  vers un second transporteur d'électron intersystème, la plastocyanine (PC). Cette plastocyanine assure le transfert des électrons du cytochrome  $b_6-f$  vers le photosystème I. La plastocyanine est une protéine qui est faiblement liée à la face interne (côté luminale) de la membrane du thylacoïde (19). Lorsque le complexe cytochrome  $b_6-f$  réduit la plastocyanine, cette dernière diffuse dans le lumen même du thylacoïde pour atteindre le photosystème (19).

Le photosystème I est situé du côté réductant de la chaîne de transfert d'électrons (figure 1.5). Il catalyse à l'aide de la lumière le transfert des électrons provenant de la plastocyanine vers l'extrémité terminale de la chaîne dans la membrane. C'est à cette extrémité qu'a lieu la réduction du  $NADP^+$  en  $NADPH$ . Le complexe possède une "paire spéciale" de molécules de chlorophylle appelée, P-700, qui lui sert de donneur primaire d'électrons (24). D'autres composantes assurent le transfert de l'électron vers la ferrédoxine. La ferrédoxine est une protéine soluble dans l'eau qui sert de transporteur d'électron puisque le photosystème I ne réduit pas directement le  $NADP^+$  (24). La ferrédoxine réduit le  $NADP^+$  à l'aide de l'enzyme ferrédoxine- $NADP^+$  réductase ( $NADP$ -réd). Cette enzyme peut aussi participer à un transfert d'électron cyclique autour du photosystème I. Un tel cycle a lieu lorsque le rapport  $NADPH/NADP^+$  est élevé. Puisque l'appareil photosynthétique n'a plus besoin de produire du  $NADPH$ ,

l'enzyme redirige les électrons vers le complexe cytochrome  $b_6-f$  (14). La plastocyanine assure le retour des électrons vers le photosystème I. Ce transport cyclique occasionne un blocage ou ralentissement au niveau de l'activité du photosystème II et par conséquent diminue la rentrée de protons dans la lumière du thylacoïde. Heureusement, au cours de ce transport cyclique autour du photosystème I, il y a des protons qui sont transférés de la matrice du chloroplaste vers la lumière du thylacoïde; ce qui contribue à maintenir un gradient de protons à travers la membrane (14).

Ainsi, des électrons issus de la dissociation de molécules d'eau (effectuée par le photosystème II) cheminent le long de la chaîne de transfert d'électrons. Ils passent par le complexe cytochrome  $b_6-f$  et le photosystème I pour en arriver à réduire le  $NADP^+$ . Comme tel, le transfert d'électrons photosynthétiques à l'intérieur de la membrane est terminé. Reste maintenant les réactions "bio-chimiques" à se dérouler dans la matrice du chloroplaste (stroma) avec les produits de la phase lumineuse (ATP, NADPH).

### **1.3.2 Aspect fonctionnel et structurel**

Il y a donc au moins deux sources à protons le long de la chaîne de transfert d'électrons qui contribuent à la formation d'un gradient à travers la membrane: les protons issus de la dissociation de l'eau et libérés dans la lumière du thylacoïde et les protons provenant du stroma qui sont captés et largués dans le lumen du thylacoïde par les plastoquinones. Ce gradient ionique à travers la membrane du thylacoïde sert de source d'énergie pour la photophosphorylation, c'est-à-dire la synthèse de l'ATP par le facteur de couplage (figure 1.5). L'ATP est formé à partir d'ADP et de  $P_i$  que nous retrouvons dans le stroma du chloroplaste.

Nous avons vu qu'il existe une différenciation organisationnelle des membranes des thylacoïdes. Elles forment des empilements (granums) ou des lamelles intergranaires. Cette différenciation s'accompagne d'une distribution des différents complexes protéiniques entre les grana et les lamelles intergranaires. Les photosystèmes I sont localisés principalement dans les lamelles intergranaires. Ces lamelles sont en contact avec le stroma ; le photosystème I se trouve ainsi à avoir accès au  $NADP^+$ .

Les photosystèmes II, quant à eux, sont presque exclusivement localisés dans les granums tandis que les cytochromes  $b_6-f$  se retrouvent dans les deux régions (17, 22).

## **1.4 LE PHOTOSYSTÈME II**

Le photosystème II est l'un des deux complexes protéines-chlorophylles qui forment l'appareil photosynthétique. Nous le retrouvons du côté oxydant de la chaîne de transfert d'électrons. Il catalyse à l'aide de l'énergie lumineuse le transfert des électrons de l'eau vers la plastoquinone.

Hormis les antennes collectrices de lumière associées avec ce photosystème, nous distinguons deux régions importantes (21). L'une d'entre elles forme le centre réactionnel. C'est là qu'a lieu la séparation de charge. L'autre forme le complexe producteur d'oxygène. C'est là qu'a lieu la dissociation de l'eau.

### **1.4.1. Sa fonction**

La fonction du photosystème II est de fournir, suite à la réaction photochimique primaire dans le centre réactionnel, l'énergie nécessaire à l'induction de la série de réactions d'oxydoréduction qui résultera en la dissociation de l'eau et le transfert des électrons provenant de cette dissociation vers la molécule de plastoquinone (25-26).

### **1.4.2. Le transfert des électrons chez le PS II**

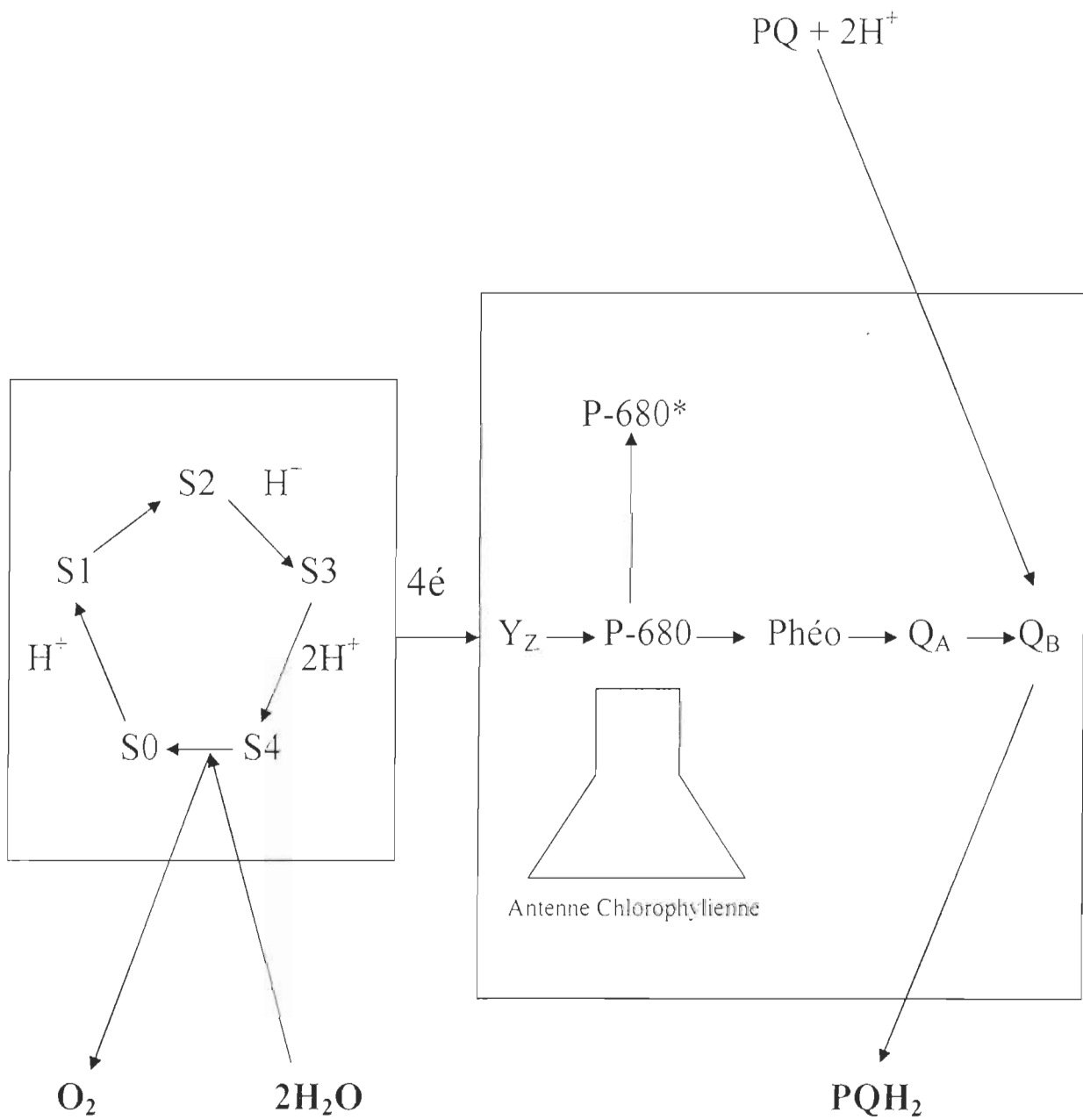
Dans le photosystème II, le transfert des électrons comporte au moins cinq composantes :  $Y_Z$ , P-680, Phé $\phi$ ,  $Q_A$  et  $Q_B$  (figure 1.6) (27). Ce transfert a lieu perpendiculairement au plan de la membrane, c'est-à-dire de l'intérieur (côté lumière) vers l'extérieur (côté stroma) (figure 1.5) (28).

Suite à l'absorption d'un photon par les pigments de l'antenne chlorophyllienne, l'énergie d'excitation est canalisée vers le centre réactionnel. Là, une "paire spéciale" de molécules de chlorophylle, appelée P-680<sup>5</sup>, est excitée (27). P-680 sert de donneur primaire d'électrons au photosystème II (24). P-680\* donne un électron à une molécule de phéophytine (Phéo) qui agit comme accepteur primaire d'électrons (20, 26, 29). Cette phéophytine est située du même côté de la membrane que la "paire spéciale" P-680 (24). Deux événements peuvent arriver. Le premier est que la phéophytine réduite donne à son tour son électron à l'accepteur secondaire du photosystème II, une quinone connue sous le nom de Q<sub>A</sub>. Ce transfert d'électrons a lieu à l'intérieur de la centaine de picosecondes (14, 24, 30). La séparation de charge est alors stabilisée. Si Q<sub>A</sub> est déjà réduite, alors il y a recombinaison de charge et la Phéo<sup>-</sup> redonne l'électron à P-680<sup>+</sup>, un transfert de l'ordre de la dizaine de picosecondes (24, 30).

Si la séparation de charge est stabilisée, Q<sub>A</sub><sup>-</sup> transfère alors l'électron à un site Q<sub>B</sub> où est liée une molécule de plastoquinone (PQ) ; un transfert qui s'effectue plus lentement que les précédents (200 ps). Dans le cas où elle ne pourrait effectuer ce transfert, l'électron retourne par recombinaison à P-680<sup>+</sup>. Les molécules de PQ (hydrophobes) sont nombreuses dans la phase lipidique de la membrane (25).

Le remplacement de l'électron perdu initialement par P-680 lors de la séparation de charge se fait via un donneur secondaire d'électrons nommé Y<sub>Z</sub>. Ce transfert est de l'ordre des ns. Ce composé Z serait un acide aminé du polypeptide D<sub>1</sub> (24, 27). Il doit, lui aussi, regagner à son tour un électron. Il y parvient grâce à un complexe catalytique qui dissocie l'eau en électrons, protons et O<sub>2</sub>; c'est le complexe producteur d'oxygène.

<sup>5</sup> Désignée ainsi parce qu'elle absorbe la lumière de 680 nm de longueur d'onde.



**FIGURE 1.6 :** Le transfert des électrons chez le PS II

Lorsque le site  $Q_B$  est à nouveau réduit (doublement réduit) de la façon décrite ci-haut, on obtient par protonation une plastoquinone ( $Q_BH_2$ ) liée. La plastoquinone  $Q_BH_2$  est alors larguée et remplacée par une autre plastoquinone. La plastoquinone  $Q_BH_2$  diffuse dans la phase lipidique de la membrane pour aller donner ses électrons au complexe cytochrome  $b_6-f$  et larguer ses protons dans la lumière du thylacoïde (20).

### 1.4.3. Sa structure

Le photosystème II est constitué d'une vingtaine de protéines intrinsèques et extrinsèques, dont celles ayant les fonctions les plus connues sont :  $D_1$ ,  $D_2$ ,  $cyt-b_{559}$ , CP-43, CP-47, LHCII, 33 kDa, 23kDa et 18 kDa. Certaines de ces protéines portent les composantes de la chaîne de transfert d'électron alors que d'autres sont associées avec des pigments. Comme mentionné au début de cette section, il y a deux régions : le centre réactionnel et le complexe producteur d'oxygène. Cette dernière région est décrite dans la section suivante; aussi ce qui suit porte sur les polypeptides qui forment le centre réactionnel et les polypeptides qui l'avoisine. Cependant, notons que les polypeptides CP-47 et CP-43 sont vraisemblablement impliqués dans le processus de dissociation de l'eau (31-32)

L'attribution du centre réactionnel à des protéines du photosystème II laissait place à deux hypothèses. L'une d'entre elle voulait que ce soit le polypeptide CP-47 qui contienne le centre (14, 33) ; l'autre, que ce soit les polypeptides  $D_1$  et  $D_2$  (33-35).

L'attribution fut déterminé clairement à la fin des années 1980 par une meilleure connaissance de la structure du photosystème II; grâce à l'isolation en 1987 du complexe et à la purification de ce dernier jusqu'à l'obtention d'une préparation de centres réactionnels photochimiquement actifs de photosystèmes II (35-36).

Cette préparation est seulement constituée des polypeptides de 32 et 34 kDa ( $D_1$  et  $D_2$  respectivement) et du cytochrome b-559. Elle a ainsi fourni un support expérimental à une proposition tirée des analyses comparatives avec la bactérie pourpre dont la structure du centre réactionnel avait été déterminée par analyse chrystallographique au rayon-X (34, 37). Il était suggéré alors en se basant sur l'homologie entre les séquences d'acides aminés des sous-unités L et M de la bactérie pourpre et des polypeptides  $D_1$  et  $D_2$ , que ces derniers formaient le cœur du centre réactionnel du photosystème II (38).

Avec ces développements sur l'identité des polypeptides formant le centre réactionnel, un modèle possible du photosystème II est présenté à la figure 1.7 (23).

Le centre réactionnel serait composé des polypeptides  $D_1$  et  $D_2$ . Chacun possède cinq segments transmembranaires (35). C'est par  $D_1$  que les électrons du complexe producteur d'oxygène pénètrent dans le centre réactionnel, et c'est aussi par  $D_1$  qu'ils en sortent.  $D_1$  possède la composante Z et le site  $Q_B$ ; tous deux appartenant à la chaîne de transfert des électrons.  $D_1$  est aussi connu sous le nom de  $Q_B$ -protéine.  $D_2$  porte la quinone  $Q_A$ . Les composantes P-680 et Phéo ne sont pas encore bien localisées, mais sont assurément dans l'hétérodimère  $D_1/D_2$  (21).

Le cytochrome b-559 isolé avec  $D_1$  et  $D_2$  (36) se présente comme un hétérodimère. L'apoprotéine consiste en deux sous-unités, un polypeptide de masse moléculaire de 9 kDa et un autre de 4 kDa (20). Son rôle dans le photosystème n'est pas très clair (20-21). Le cytochrome existe sous une forme de haut potentiel et de bas potentiel, mais la conversion de l'un à l'autre ne correspond pas avec les changements d'activité du photosystème II (21). Il se pourrait cependant qu'il soit impliqué dans le transport cyclique autour du photosystème II (24, 21).

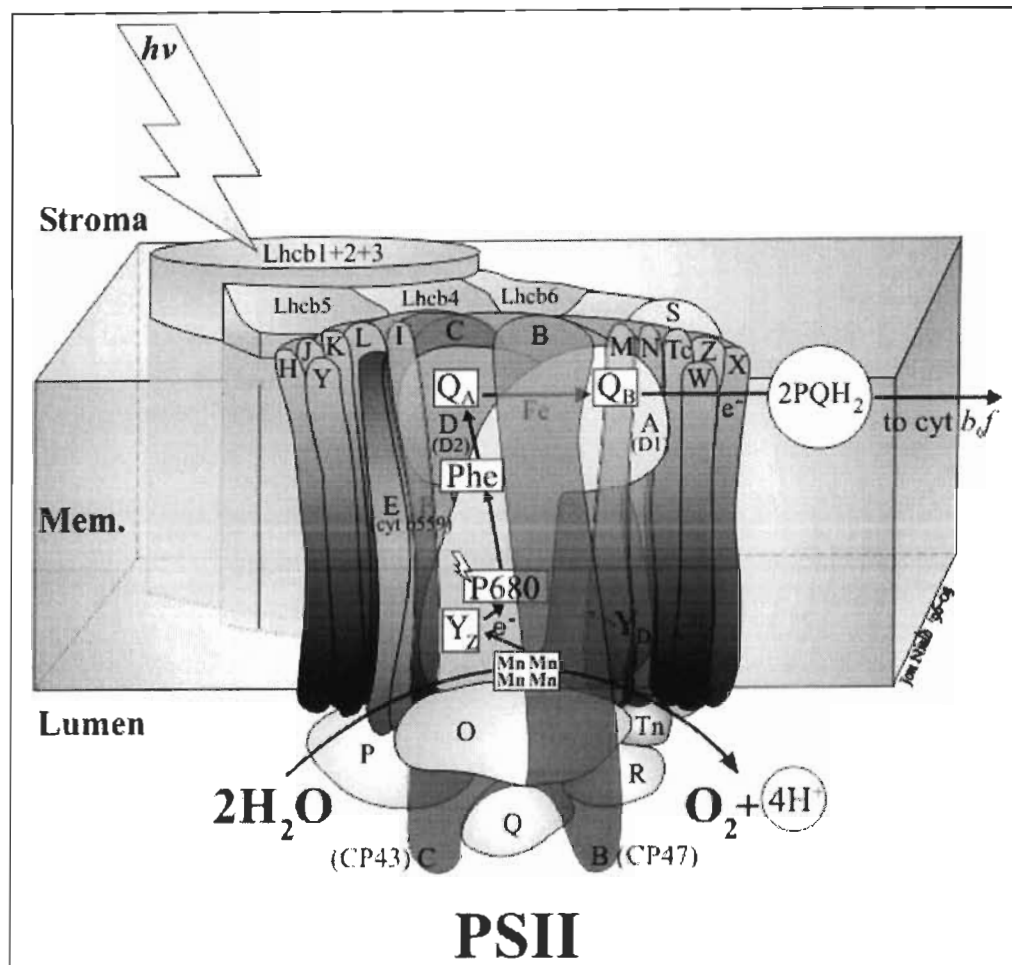


FIGURE 1.7 : Modèle du photosystème II

(tiré de la réf. 23)



Nous retrouvons d'autres polypeptides intrinsèques dans le complexe du photosystème II mais leur fonction n'a pas encore été identifiée. Ils sont peut-être nécessaires pour la conformation du complexe (21). Un polypeptide d'environ 4.5 kDa a été découvert dans la préparation du complexe D<sub>1</sub>/D<sub>2</sub>/Cyt b-559 (39-40).

## 1.5 LE COMPLEXE D'ÉMISSION D'OXYGÈNE

Le complexe producteur d'oxygène (CPO) forme une zone importante du photosystème II (38). Il est situé du côté de la face interne de la membrane du thylacoïde (30) et sa composition se résume en au moins trois polypeptides extrinsèques : 33, 23 et 18 kDa (figure 1.7) (41). Ce complexe fournit en électrons le centre réactionnel du photosystème II et, ce faisant, il produit de l'oxygène moléculaire (O<sub>2</sub>), d'où il tire son nom.

Lorsqu'une séparation de charge a lieu au centre réactionnel du photosystème II, la "paire spéciale" de molécules de chlorophylle-a perd un électron au profit de la molécule de phéophytine. Cet électron perdu doit être remplacé lorsqu'il n'y a pas eu recombinaison des charges. Le composé Z sur D<sub>1</sub> se charge de redonner un électron à P-680<sup>+</sup>. Ce même composé regagne lui aussi un électron via le CPO. Le CPO, par contre, va perdre ainsi jusqu'à quatre électrons avant de devoir lui-même s'approvisionner (27, 30).

Le CPO, pour s'approvisionner en électrons, effectue la dissociation de l'eau. L'eau est un élément abondant dans le voisinage du complexe qui est situé à proximité de la lumière du thylacoïde.

Selon le modèle actuel du processus de la dissociation de l'eau, le CPO accumule de façon successive quatre charges positives avant de produire une molécule d'oxygène. Chacune de ces accumulations, due à la perte d'un électron, correspond à un état de distribution de charge appelé S<sub>0</sub>, S<sub>1</sub>, ..., S<sub>4</sub> où l'indice indique le nombre de charges positives accumulées. La molécule d'oxygène est émise lors de l'état S<sub>4</sub> qui est un état du CPO très instable. Cet état correspond à une distribution de quatre charges positives.

La figure 1.8 représente ce cycle à quatre étapes; la transition  $S_4-S_0$  étant instantanée, nous considérons qu'il y a seulement 4 étapes (27).

À chaque avancement ou transition d'état, de l'énergie lumineuse est requise pour pouvoir effectuer la séparation de charge au centre réactionnel et doter ainsi le photosystème II du pouvoir oxydant nécessaire pour arracher un électron au CPO. Il y aurait aussi, comme le montre la figure 1.8, une libération de protons; à la transition  $S_0-S_1$  (un proton),  $S_2-S_3$  (un proton), et  $S_3-S_4$  (deux protons). Nous ne savons pas si ces deux protons proviennent directement de l'eau, de telle sorte qu'il n'est pas possible de dire pour le moment si l'eau est oxydée à l'état  $S_4$  ou au cours des diverses transitions d'état (27).

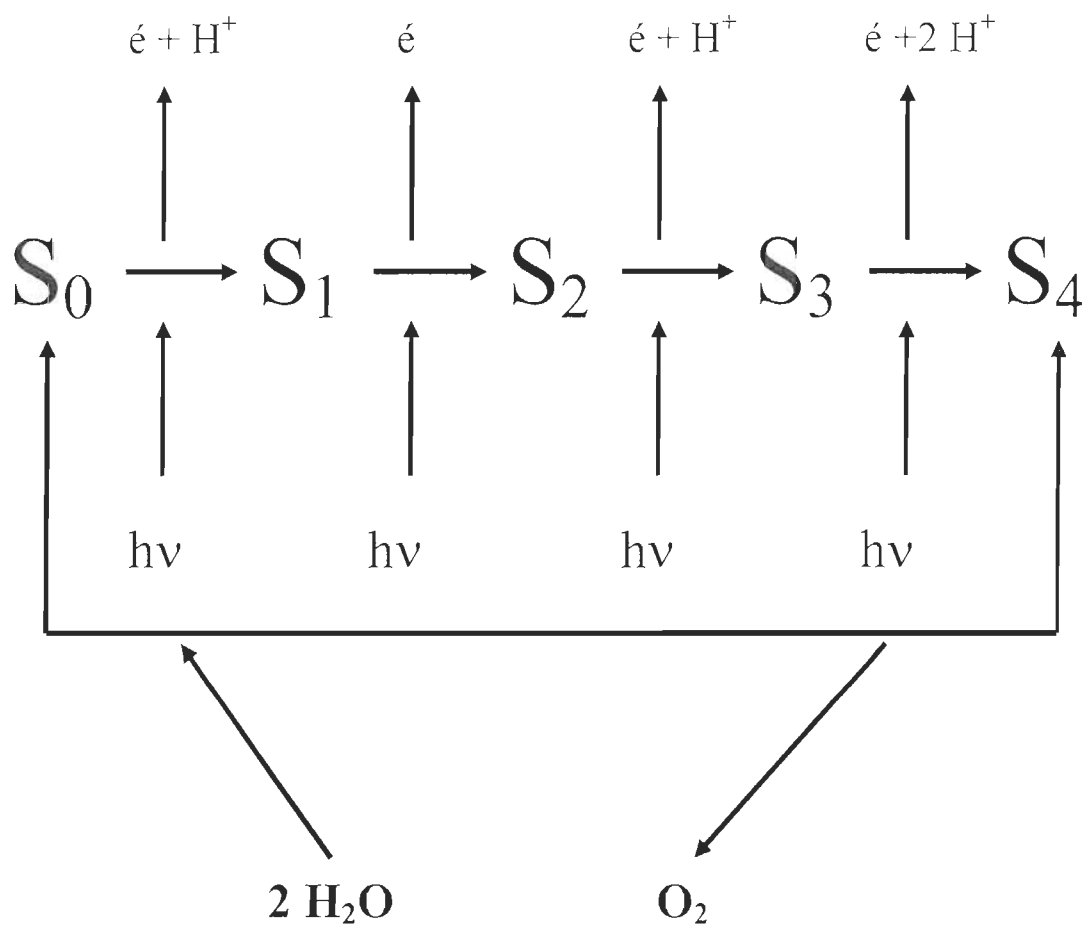


FIGURE 1.8 : Cycle d'oxydation de l'eau

### 1.5.1. Les atomes de manganèse

Il faut pour que le CPO puisse accumuler autant de charges positives, un accumulateur de charges qui puisse lui fournir des électrons. Un ensemble de quatre atomes de manganèse joue ce rôle pour le CPO (27, 41-44). Le manganèse peut donner jusqu'à sept électrons. L'oxydation du manganèse apparaît lors des transitions  $S_0$ - $S_1$  et  $S_1$ - $S_2$  alors qu'il existe une controverse à savoir si le manganèse est oxydé à la transition  $S_2$ - $S_3$  (21). La charge positive accumulée par le CPO lors de cette transition pourrait être due à un composé histidine appartenant à une des protéines du CPO (27).

La localisation des atomes de manganèse est difficile à déterminer (43). Elle pourrait être située quelque part entre les polypeptides  $D_1$  et  $D_2$  du centre réactionnel et le polypeptide de 33 kDa extrinsèque (figure 1.7) (27).

L'organisation structurale ou l'arrangement des quatre atomes à l'intérieur du CPO demeure inconnu. Plusieurs modèles ont été suggérés ; la plupart apporte des interprétations contradictoires, mais ces recherches tendent à clarifier cet arrangement (21, 42). Il semblerait que deux d'entre eux formeraient un complexe binucléaire à l'état  $S_1$  (27).

### 1.5.2. Les ions chlorure ( $Cl^-$ ) et calcium ( $Ca^{+2}$ )

Les ions chlorure et calcium sont des cofacteurs essentiels dans le processus de la dissociation de l'eau (21, 38, 41, 43, 45).

Le chlorure a un grand nombre de sites de liaison, mais ceux-ci restent indéterminés (21). Certains semblent se fixer tout près du complexe formé par les manganèses (27). Cet ion pourrait stabiliser l'accumulation de charge positive par le CPO ; d'ailleurs, sa présence est davantage remarquée lorsque le CPO est dans l'état  $S_2$  ou  $S_3$  (27). En absence de cet ion, la transition  $S_2$  à  $S_3$  est inhibée. Par contre, puisqu'il compétitionne efficacement (par exemple, avec l'hydroxylamine qui est un inhibiteur du CPO), il semblerait jouer le rôle de ligand pour le manganèse (41). Il pourrait aussi faciliter la libération des protons lors

du processus de dissociation (21, 27). Le rôle des ions chlorure reste toutefois à être déterminé avec précision.

Le calcium pourrait jouer un rôle dans le maintien d'une conformation fonctionnelle des polypeptides associés au CPO. Son absence inhibe la transition de  $S_3$  à  $S_0$ , soit la production d'oxygène (27, 44).

### **1.5.3. Les polypeptides extrinsèques**

Les trois polypeptides de poids moléculaire apparent de 18, 23, et 33 kDa sont très hydrophiles. Chacun contient une grande proportion d'acides aminés polaires (21, 41, 46). Il est possible de les enlever de la membrane en changeant la force ionique du milieu ou le pH, sans l'aide toutefois de détergents, ce qui laisse penser qu'ils sont extrinsèques (41).

Les polypeptides de 23 et 18 kDa peuvent être enlevés en augmentant la force ionique du milieu; ce qui suggère que leur liaison avec la membrane est de nature, à tout le moins, électrostatique. Pour le polypeptide de 33 kDa, il faut plus : un pH alcalin, une concentration élevée en cation divalent, pour ne nommer que ceux-là. La nature de la liaison de la 33 kDa avec la membrane pourrait impliquer des ponts hydrogène et des interactions hydrophobes (41).

D'après des études de recombinaison séquentielle, il a été démontré que le polypeptide de 18 kDa est lié à la 23 kDa et que celle-ci a un site de liaison sur le polypeptide de 33 kDa. L'absence de la 23 kDa de la membrane ne permet pas la recombinaison de la 18 kDa (25). Les polypeptides de 23 et 33 kDa peuvent être ancrés au complexe du photosystème II par liaison avec certaines protéines intrinsèques (47). La 33 kDa peut se lier avec le cœur du centre réactionnel (extension hydrophile de D1 ?) et/ou avec l'antenne interne de celui-ci (extension hydrophile de CP-47 ?) (47), tandis que le polypeptide de 23 kDa

pourrait se lier à l'antenne constituée de pigments accessoires (extension hydrophile du LHC II ?) (21, 41)

La fonction de ces polypeptides dans le processus de la dissociation de l'eau n'est pas encore connu avec exactitude.

Les polypeptides de 18 et 23 kDa pourraient protéger le site de la dissociation de l'eau en empêchant d'autres éléments de venir perturber le système (21). Leur absence de la membrane cause une inhibition de l'activité du CPO mais l'ajout d'ions calcium et chlorure permet de restaurer l'activité (30). Ce qui laisse croire à l'existence de sites de liaison pour ces ions chlorure et calcium sur des protéines de la membrane (41). Si on réinsère la 23 kDa seule, la concentration en ions chlorure nécessaire pour restaurer l'activité est moindre qu'en absence des deux polypeptides (18 et 23 kDa). De plus, l'ajout d'ions chlorure est encore moindre si la 18 kDa était réinsérée avec la 23 kDa (30, 41).

Nous n'avons pas encore éclairci si la présence de ces polypeptides de 18 et 23 kDa sur la membrane donne une conformation au CPO qui lui permet de fournir une meilleure affinité pour la liaison des ions calcium et chlorure et/ou s'ils permettent au CPO de contenir ces ions en une concentration locale par attraction électrostatique avec leur acides aminés polaires. Ceci permet aux ions, le moment venu, de jouer leur rôle dans le processus (41).

Enfin, le polypeptide de 33 kDa pourrait être associé dans la stabilisation et peut-être même dans la coordination d'au moins deux atomes de manganèse avec d'autres protéines de la membrane (30, 41).

## 1.6 LES COLLECTEURS DE LUMIÈRE

Nous avons vu que le complexe du photosystème II est emboîté dans les thylacoïdes des plantes. Le complexe est constitué de deux parties (structurellement et fonctionnellement différentes). D'abord, le cœur du complexe contient le centre réactionnel photochimique lié aux protéines D1 et D2 et les complexes collecteurs de lumière CP43 et CP47 comme principaux constituants; l'autre partie du photosystème est formée par l'antenne périphérique (complexes pigment-protéine liant plusieurs molécules de Chl a, Chl b et de xanthophyll).

Dans chacun des complexes CP43 et CP47 se retrouvent environ 14 molécules de chlorophylle a et 2-3 molécules de  $\beta$ -carotène. Ces complexes, CP-47 et CP-43, sont de poids moléculaire apparent de 45-51 et 40-45 kDa respectivement (21, 31). Chacun de ces complexes possède 7 segments transmembranaires avec un important domaine (extension) hydrophyle (25). Leur rôle, en plus de collecter la lumière, serait de permettre le maintien du photosystème II dans une conformation stable (48). Le rôle principal de CP43 et CP-47 est de transférer l'énergie d'excitation provenant des antennes périphériques vers le centre réactionnel, là où est initié la séparation de charge (49-50). La présence de caroténoïdes comme pigment accessoire pourrait jouer un rôle dans le transfert de l'énergie d'excitation et comme collecteur de lumière. En cas de lumière excessive, les caroténoïdes joueraient un rôle protecteur pour le photosystème (51-52)

Certaines molécules de l'antenne périphérique seraient étroitement associées avec le cœur du photosystème II. Il est suggéré que les protéines périphérique CP26 et S-LHCII transfèrent leur énergie d'excitation à CP43, tandis que CP29 et CP24 transfèrent leur énergie à CP47 (50).

Tous ces collecteurs de lumière se présentent dans le photosystème II comme des complexes protéines-chlorophylles hydrophobes insérés dans la phase lipidique du thylacoïde. Cette association des molécules de chlorophylle avec la protéine assure l'efficacité du transfert de l'énergie d'excitation vers le centre réactionnel et entre les

molécules elles-mêmes. L'orientation et la distance des molécules de chlorophylle sont ainsi régularisées par la liaison des molécules sur la protéine (53).

La variété des collecteurs de lumière présents dans le photosystème II permet à la plante d'étendre son spectre d'absorption.



## 1.7 LE BUT DU TRAVAIL

Le but de notre travail était de caractériser l'action des anions sulfate et sulfite chez le complexe du photosystème II. Des études intensives ont été réalisées sur les effets du  $\text{SO}_2$  sur le processus physiologique des plantes (1-5). Les réactions lumineuses de la photosynthèse sont connues comme étant une cible sensible de l'effet inhibiteur du  $\text{SO}_2$  (6-9). Le  $\text{SO}_2$  absorbé par les plantes est converti en anions bisulfite, sulfite, et sulfate dans les cellules végétales (9-11). Il est connu que l'anion sulfate s'accumule dans le cytosole de la plante. Quelques expériences démontrent qu'après fumigation au  $\text{SO}_2$ , le sulfate est difficilement éliminé des cellules (10, 12). L'accumulation de sulfate dans la cellule devrait amener la présence de sulfate dans les chloroplastes (13). Bien que le sulfate interfère avec l'activité du chloroplaste, le site de son action dans la membrane du chloroplaste n'est pas précisément identifié (9, 11).

Nous avons utilisé des membranes enrichies en photosystème II et des membranes de thylacoïdes que nous avons traitées avec diverses concentrations de ces ions. Nous avons été intéressés par l'effet du sulfate et du sulfite sur la fonction et la structure du complexe du PS II. Le transfert d'énergie fut aussi à l'étude lors de l'analyse des effets du sulfate. L'approche expérimentale consistait à utiliser la mesure en dégagement d'oxygène des membranes pour déterminer l'effet des anions sur l'activité des membranes. L'électrophorèse comme technique d'analyse de la composition en polypeptides a été utilisée pour connaître l'effet sur la structure des membranes de ces anions. Enfin, pour connaître le sort réservé à l'énergie d'excitation arrivant aux collecteurs de lumière, nous avons déterminé les valeurs de désactivation thermique pour les membranes traitées et non traitées au sulfate et incorporées dans des films de PVA.

## CHAPITRE 2

### MATÉRIELS ET MÉTHODES

#### 2.1 PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Les échantillons de thylacoïde et de PS II ont été préparés à partir de feuilles d'orge (54-55).

D'abord, les graines étaient traitées une quinzaine de minutes dans une solution diluée de peroxyde d'hydrogène à 20% afin d'éviter la présence de champignons. Les graines ont été ensuite semées dans un bac contenant de la « vermiculite ». Un régime de lumière continue était fourni par une lampe (Phillips) au sodium à haute pression de  $40 \text{ mW cm}^{-2}$ . Arrosées matin et soir avec de l'eau du robinet, les feuilles étaient récoltées à la septième journée.

Une attention particulière a été portée à la coupe des feuilles. Il existe une hétérogénéité des chloroplastes dans la feuille. Cette hétérogénéité est due à un gradient d'âge qui va de la base de la feuille au sommet de celle-ci (16). Seulement le haut des feuilles a été considéré pour être sûr d'avoir une homogénéité des chloroplastes (chloroplastes développés).

##### 2.1.1. Les thylacoïdes

Toutes les manipulations ont été effectuées sur de la glace et en présence de lumière verte.

Les feuilles d'orge (cent grammes) furent coupées et lavées avec de l'eau distillé. Recoupées en petits morceaux, elles ont été broyées pendant quinze secondes à l'aide d'un mélangeur domestique. Le mélangeur domestique était muni de lames supplémentaires montées sur un support spécialement conçu. Lors du broyage, 250 ml d'un milieu de broyage (tableau 2.1, solution A) était présent sous forme à demi gelé.

Cette homogénéisation des tissus doit pouvoir briser suffisamment de cellules de façon à obtenir le plus de chloroplastes possibles. Cependant, l'intégrité des chloroplastes obtenus dépend du temps de broyage. Si l'enveloppe du chloroplaste reste intacte, celle-ci protégera le système photosynthétique contre de possibles dommages structurels causés par les débris cellulaires. Un plus long temps de broyage augmentera seulement la proportion de chloroplastes brisés et exposera les membranes du thylacoïde aux effets néfastes des débris cellulaires (54).

Après le broyage, nous filtrons le mélange à l'aide d'un coton à fromage et d'un tamis à pore de 25  $\mu\text{m}$  de diamètre. Le filtrat est rapidement centrifugé à 3000 x g pendant 90 secondes; le culot contenant les chloroplastes est mis en suspension dans une solution hypotonique de lavage (tableau 2.1, solution B). Une seconde centrifugation à 5000 x g pendant 5 minutes permet d'obtenir un culot de thylacoïdes. Ce culot est finalement mis en suspension dans un petit volume d'un milieu approprié (tableau 2.1, solution C, sauf section 2.7.2).

L'activité moyenne en dégagement d'oxygène de ces échantillons de thylacoïde était de 150-250  $\mu\text{mol O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ Chl h}^{-1}$ .

**TABLEAU 2.1** Composition chimique des solutions utilisées lors de l'extraction des membranes de thylacoïde.

<b>Milieu de broyage (solution A)</b>	
Tricine-NaOH (pH 7.9)	50 mM
Sucrose	400 mM
NaCl	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
<b>Milieu de lavage (solution B)</b>	
Tricine-NaOH (pH 7.9)	20 mM
NaCl	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
<b>Milieu de mise en suspension finale (solution C)</b>	
Tricine-NaOH (pH 7.9)	20 mM
Sucrose	100 mM
NaCl	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM

### 2.1.2. Les membranes enrichies en PS II

La préparation décrite ci-dessous produit des membranes enrichies en PS II. Le détergent Triton (X-100) est utilisé pour la solubilisation des membranes.

Les feuilles d'orge (cent grammes) sont coupées et lavées avec de l'eau distillée, recoupées en petits morceaux et placées dans un mélangeur domestique qui contient déjà 250 ml du milieu de broyage (tableau 2.2, solution A) sous forme à demi gelé. Le temps de broyage est de 6 secondes et nous filtrons le mélange obtenu à l'aide des mêmes filtres employés pour la préparation des thylacoïdes.

Une fois la filtration effectuée, le filtrat est rapidement centrifugé à 4000 x g pendant 90 secondes. Le culot qui contient les thylacoïdes est mis en suspension dans une solution hypoosmotique de lavage (tableau 2.2, solution B).

Nous centrifugeons à nouveau à 1500 x g pendant 5 minutes. Le culot est mis en suspension dans la solution  $C^-$  (voir tableau 2.2). Les thylacoïdes sont traités avec le détergent Triton X-100 (tableau 2.2, solution  $C^+$ ) à 20 mg  $\text{mg}^{-1}$  Chl pendant 23 minutes.

Suite à ce traitement, le matériel est centrifugé à 4000 x g pendant 3 minutes et le surnageant est gardé alors que le culot est disposé. Les membranes enrichies en PS II sont récoltées par une dernière centrifugation du surnageant à 35 000 x g pendant 35 minutes. Le culot est mis en suspension dans le milieu  $C^-$  (voir tableau 2).

L'activité moyenne en dégagement d'oxygène de ces échantillons de membranes enrichies en PSII est de 400-600  $\mu\text{mol O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ Chl h}^{-1}$ .

**TABLEAU 2.2** Composition chimique des solutions utilisées lors de l'extraction des membranes enrichies en PS II.

<b>Milieu de broyage (solution A)</b>	
Sorbitol-HCl (pH 6.5)	333 mM
Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
D-iso-ascorbate	2 mM
<b>Milieu de lavage (solution B)</b>	
Hepes-NaOH (pH 7.6)	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
EDTA	2 mM
MnCl <sub>2</sub>	1 mM
NaHCO <sub>3</sub>	10 mM
<b>Milieu de mise en suspension (solution C<sup>-</sup>)</b>	
Mes-NaOH (pH 6.0)	40 mM
Sucrose	400 mM
NaCl	15 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
<b>Milieu de traitement au Triton X-100 (solution C<sup>+</sup>)</b>	
4g 100 ml de C <sup>+</sup>	

## 2.2 DÉTERMINATION DE LA CONCENTRATION EN CHLOROPHYLLE DES ÉCHANTILLONS

La concentration en chlorophylle d'un échantillon de thylacoïdes ou d'un échantillon de membranes enrichies en PS II a été déterminée selon la méthode d'Arnon (56).

### Étapes de la méthode

- 1- Prendre 10  $\mu\text{l}$  de l'échantillon.
- 2- Extraire la chlorophylle en diluant ce 10  $\mu\text{l}$  dans de l'acétone à 80 % pour obtenir un volume de 10 ml.
- 3- Filtrer.
- 4- Mesurer l'absorbance du filtrat à 663 nm ( $A_{663}$ ) et à 645 nm ( $A_{645}$ ).
- 5- La concentration en chlorophylle est obtenue à l'aide de l'équation :

$$[\text{Chl}] \text{ en } \mu\text{g ml}^{-1} = 20.2 A_{645} + 8.02 A_{663} \quad (2.1)$$

La concentration ainsi mesurée représente la concentration totale en chlorophylle-a et en chlorophylle-b. Pour avoir la concentration en chlorophylle-a seulement ou chlorophylle-b seulement, on utilise respectivement les équations suivantes :

$$[\text{Chl}_a] \text{ en } \mu\text{g ml}^{-1} = 12.7 A_{663} - 2.69 A_{645} \quad (2.2)$$

$$[\text{Chl}_b] \text{ en } \mu\text{g ml}^{-1} = 22.9 A_{645} - 4.64 A_{663} \quad (2.3)$$

## 2.3 MESURES EN ÉMISSION D'OXYGÈNE DES ÉCHANTILLONS - LA POLAROGRAPHIE

Les mesures en dégagement d'oxygène des divers échantillons de thylacoïdes et de PS II ont été prise à l'aide d'une électrode à oxygène de type Clark (voir section 2.3.1).

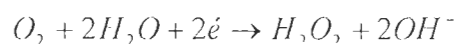
Dans un premier temps, nous calibrons l'électrode afin de déterminer la concentration en oxygène contenue dans la cellule (1 ml). De cette manière, nous obtenons une référence qui servira à calculer le dégagement d'oxygène des échantillons contenus dans cette même cellule.

Pour pouvoir effectuer les mesures, nous avons besoin de maintenir un transfert d'électrons, l'utilisation d'un accepteur exogène d'électrons approprié permet de maintenir une activité au sein de l'échantillon. Cette activité nous assure le fonctionnement (relatif à l'échantillon à être mesuré) du complexe d'émission d'oxygène.

Dans le cas des thylacoïdes ( $10 \mu\text{g Chl ml}^{-1}$ ), 2 mM de ferricyanide de potassium ( $\text{FeCN}$ ) est utilisé comme accepteur d'électron ; pour les PS II ( $10 \mu\text{g Chl ml}^{-1}$ ), 350  $\mu\text{M}$  de 2,5-dichloro-benzoquinone (DCBQ) et une minute avant la mesure, 1 mM de  $\text{CaCl}_2$  fraîchement préparé était ajouté.

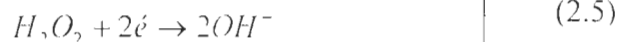
### 2.3.1. L'électrode de type Clark

Le dégagement d'oxygène des divers échantillons a été mesuré à l'aide d'une électrode de type Clark (57). Cette électrode consiste en une anode d'argent (Ag) et une cathode de platine (Pt) plongées dans une solution concentrée de KCl. Le KCl servant de pont électrolytique. L'électrode est séparée du milieu où baigne les thylacoïdes (ou les PS II) par une membrane perméable à l'oxygène. L'oxygène du milieu diffuse à travers cette membrane pour atteindre l'électrode de platine. Lorsqu'un voltage est appliqué à l'électrode, l'oxygène à la surface de la cathode de platine est réduit (voir éq. 2.4 et 2.5) ce qui abaisse sa concentration immédiate.



(2.4)

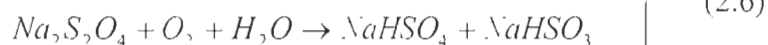




Cette baisse de concentration permet à nouveau la diffusion de l'oxygène du milieu à travers la membrane vers la cathode de platine. Ce flux d'électrons induit un changement de courant qui est une mesure de l'oxygène consommé à la cathode. Cette variation de courant dépend de la diffusion de l'oxygène à travers la membrane. En agitant le milieu, on s'assure que le changement de courant enregistré est proportionnel à la concentration d'oxygène contenue dans le milieu.

### 2.3.2. Calibrer l'électrode

L'électrode de Clark est calibrée avant chaque expérience. On mesure la concentration de l'oxygène contenue dans la cellule. Elle contient 1 ml d'eau distillée. À une température de 20 °C. De l'eau à l'air libre est saturée en oxygène selon une concentration de 0,280  $\mu\text{mol ml}^{-1}$ . On calibre en ajoutant du  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  qui réagit avec l'oxygène contenu dans l'eau selon l'équation chimique :



Ainsi, la concentration d'oxygène dans l'eau tombe à zéro. On observe alors une baisse de courant puisqu'il n'y a plus d'oxygène qui diffuse vers la cathode de platine. Cette chute de courant est proportionnelle à la concentration de l'oxygène contenu dans l'eau à 20 °C, soit 0,280  $\mu\text{mol ml}^{-1}$ . Maintenant, cette référence connue, il est possible de déterminer le dégagement d'oxygène des thylacoïdes (ou des membranes enrichies en PS II).

## **2.4 COMPOSITION EN PROTÉINES DES ÉCHANTILLONS – TECHNIQUE D'ÉLECTROPHORÈSE**

La séparation des protéines appartenant au complexe du PS II est effectuée à l'aide de la technique d'électrophorèse connue sous le nom de « SDS-PAGE » (« Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis »).

Tout d'abord, après les traitements (voir section 2.7), les échantillons sont incubés pendant 30 minutes à la température de la pièce dans un milieu de digestion des protéines (tableau 2.3, A) à une concentration en chlorophylle de 1 mg ml<sup>-1</sup>. Ce milieu agit de deux façons sur l'agrégat de protéines, il sépare les protéines les unes des autres et leur donne une même charge électrique (58).

Le mélange de protéines, après incubation, est déposé en petite quantité d'environ 20 µl à l'aide d'une micro-seringue dans des puits formés à même le premier gel d'électrophorèse composé à 5% de polyacrylamide (tableau 2.3, B). Ce gel permet aux protéines de se tasser lors des premières minutes de la migration. Les protéines par la suite vont traverser un second gel composé à 15% de polyacrylamide (tableau 2.3, C). Ce gel sert à la résolution des protéines. Chacun de ces deux gels contient, de plus, 6 M d'urée afin d'augmenter la résolution des bandes dans la région des polypeptides D1 et D2. La migration prend environ une quinzaine d'heures sous un champ électrique constant de 10 mA.

**TABLEAU 2.3 Composition chimique des solutions utilisées lors de la séparation des protéines par électrophorèse.**

<b>Milieu de digestion (solution A)</b>	
Trizma (pH 7.0)	10 mM
Sucrose	20 %
Mercaptoéthanol	10 mM
EDTA	1 mM
SDS	2 %
<b>Gel à 5 % (10 ml de solution B)</b>	
Acrylamide	5 %
Bis-acrylamide	0,13 %
Tris (pH 6.8)	0.1 M
SDS	0.1 %
Ammonium persulfate	0,025 %
Temed	16 µl
<b>Gel à 15 % (40 ml de solution C)</b>	
Acrylamide	15 %
Bis-acrylamide	0,4 %
Trizma (pH 9.1)	1 M
SDS	0.1 %
Temed	16 µl

### 2.4.1. La technique « SDS-PAGE »

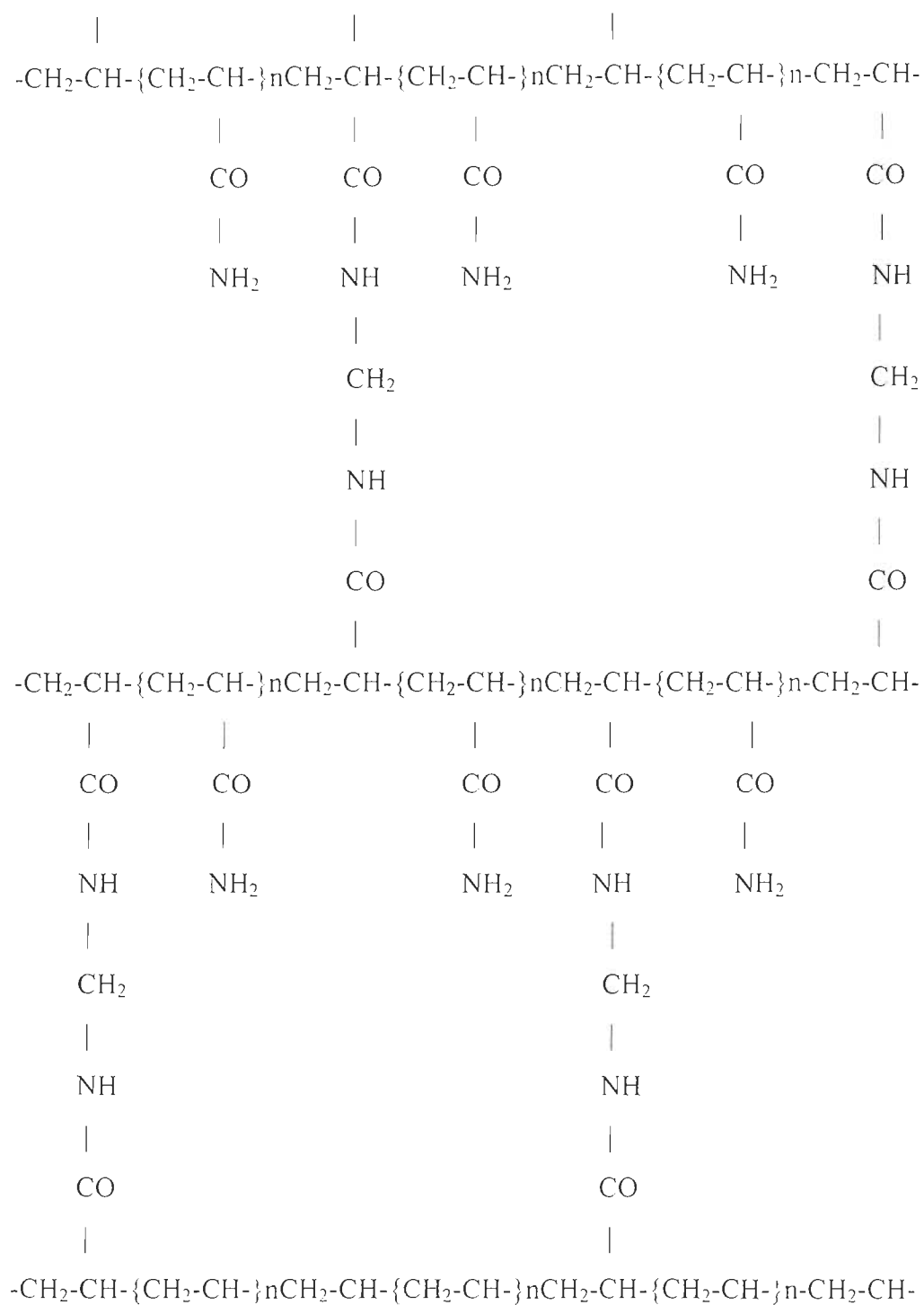
La technique « SDS-PAGE » (58) consiste à séparer, en fonction de leur taille moléculaire, un mélange de protéines préalablement chargé avec le détergent ionique SDS. La séparation s'effectue à travers un tamis moléculaire (un gel de polyacrylamide, voir figure 2.1) soumis à un champ électrique.

Comme nos échantillons contiennent des complexes de protéines, nous devons d'abord séparer individuellement les protéines formant un complexe. L'utilisation de la solution de digestion permet de le faire. La présence de mercaptoéthanol dans cette solution a pour fonction de couper les ponts di-sulfure entre les protéines et dans la protéine même. Les protéines sont ainsi dénaturées. Le détergent ionique SDS que nous retrouvons dans cette solution se lie aux protéines de manière à leur donner à toutes la même densité de charge (charge nette négative, la charge intrinsèque étant insignifiante comparée à celle apportée par le détergent). La séparation est alors faite selon la taille des protéines (58).

La migration des protéines chargées dans un champ électrique se fait à travers un tamis moléculaire composé de polyacrylamide (figure 2.1). Ce milieu favorise la séparation des protéines selon leur taille et sert également à fixer les protéines une fois l'électrophorèse terminée, évitant ainsi une diffusion des bandes (58).

Le gel de résolution à la fin de la migration est démonté de son support et soigneusement placé dans un bac contenant une solution de coloration au bleu de coomassie. Il trempe ainsi pendant environ 12 heures. Le gel est ensuite rincé abondamment avec de l'eau distillée avant d'être décoloré; cette étape fait ressortir les bandes de protéines colorées.

Le gel est finalement balayé à l'aide d'un densitomètre (Cliffird Densicomp modèle-445) pour obtenir un densitogramme représentant la résolution des bandes de protéines selon la densité de coloration des bandes. Les changements dans la quantité d'une protéine ont été évalués en comparant l'aire sous le pic de la bande de cette protéine ; après avoir été normalisé à l'aire de la bande de la protéine de 28 kDa .



**FIGURE 2.1 :** Structure chimique du gel de polyacrylamide

## **2.5 PRÉPARATION DES MILIEUX ISOTROPE ET ANISOTROPE**

Pour réaliser l'étude des spectres d'absorption, de fluorescence et de photoacoustique des échantillons de thylacoïdes (ou des membranes enrichies en PS II) traités ou non traités avec le sulfate, nous avons incorporé les échantillons dans des milieux isotrope et anisotrope (59-60). Ces milieux composés d'alcool de polyvinyle rendent stable l'échantillon et permettent de prendre les trois mesures spectroscopiques sur le même échantillon.

### **2.5.1. Milieu isotrope**

Les étapes de la préparation du milieu isotrope sont les suivantes :

- 1) Préparer une solution à 15 % d'alcool de polyvinyle.  
(PVA : « PolyVinyl Alcool »)
- 2) Chauffer cette solution à 80 °C dans un bain à température contrôlée pendant 2 h sous agitation.
- 3) Laisser refroidir à la température de la pièce.
- 4) Ajouter l'échantillon de thylacoïdes (ou de PS II) à 15 ml de la solution de PVA et agiter pendant 10 min.
- 5) Entreposer au réfrigérateur (0-4°C) pour une période de 24 h.
- 6) Étendre sur une plaque de verre rectangulaire (6 cm x 12 cm) à l'aide d'une tige de verre le mélange PVA-Échantillon.
- 7) Laisser sécher la plaque de verre en présence de pierres de  $\text{CaCl}_2$  pendant 3 à 5 jours.
- 8) Décoller le film de PVA de la plaque. On obtient l'échantillon incorporé dans un milieu isotrope.

### 2.5.2. Milieu anisotrope

Le milieu anisotrope est obtenu à l'aide du film isotrope. Pour obtenir une orientation adéquate des membranes, le film a dû être étiré de façon à obtenir un degré d'anisotropie de 300 %. Le degré d'anisotropie est fourni par l'équation :

$$\text{Degré d'anisotropie \%} = \frac{(L_f - L_i)}{L_i} \times 100 \quad (2.7)$$

où  $L_i$  est la longueur initiale du film tendu  
et  $L_f$  est la longueur finale du film étiré.

Les étapes de la préparation du milieu anisotrope sont les suivantes :

- 1) Le film de PVA dans lequel l'échantillon a été incorporé (milieu isotrope) est placé dans un espace fermé saturé en vapeur d'eau pour une période de 24 h.
- 2) On installe alors le film sur un appareil servant à étirer le film (figure 2.2).
- 3) On insère une des extrémités du film entre les deux plaques du chariot mobile (partie A de la figure 2.2).
- 4) On insère l'autre extrémité du film entre les deux plaques du cadre de métal (partie B de la figure 2.2).
- 5) À l'aide de la tête de la vis (partie C de la figure 2.2), on tend le film sans toutefois l'étirer.
- 6) On étire le film à  $4 L_i$ .
- 7) Le support (un anneau de plexiglas) est collé sur le film étiré.
- 8) On laisse ainsi le film sécher pendant 48 h.
- 9) On découpe l'échantillon. On obtient l'échantillon incorporé dans un milieu anisotrope.

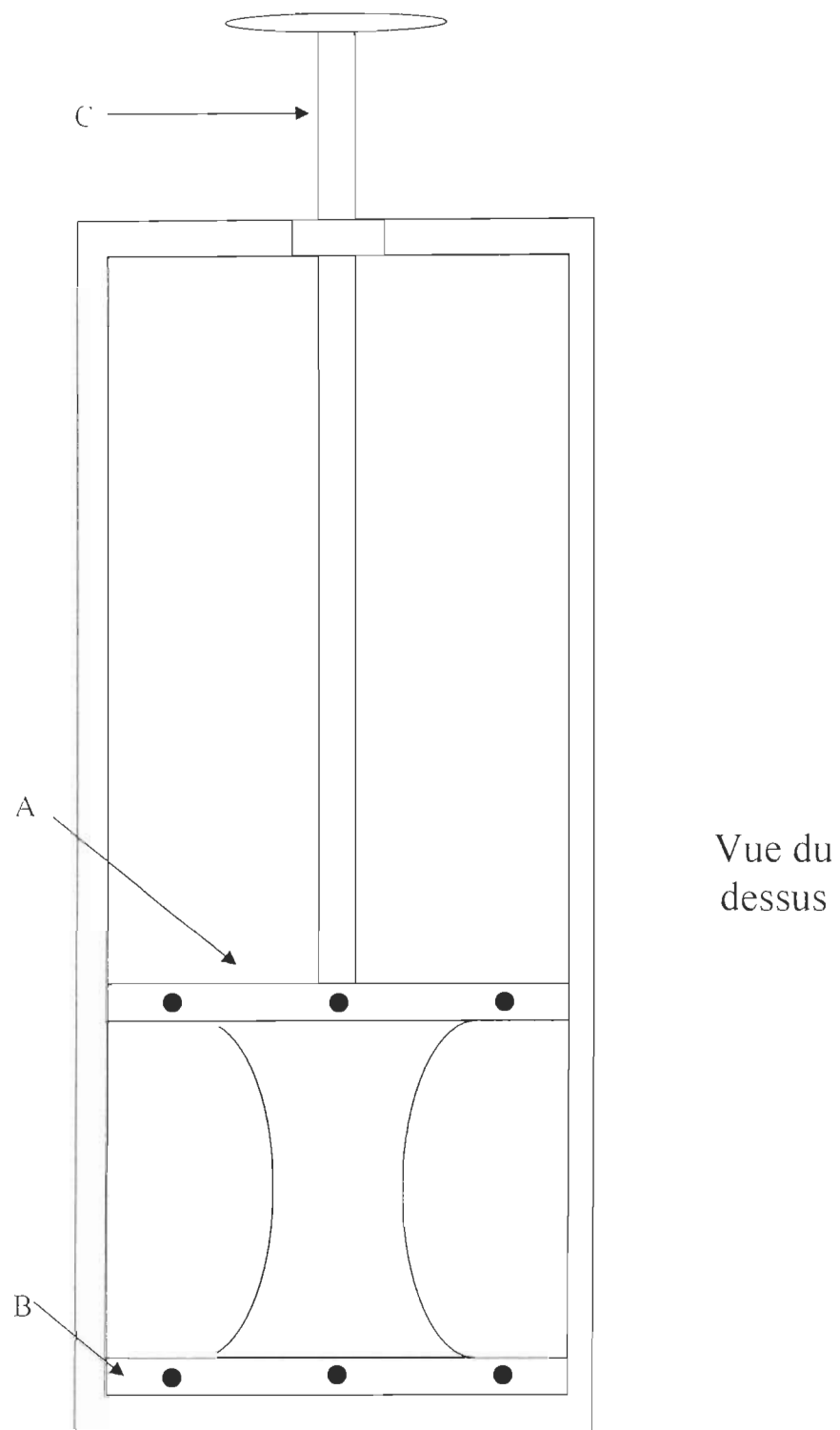


FIGURE 2.2 : L'appareil à étirement du film de PVA



## **2.6 LA SPECTROSCOPIE**

Les spectres ont été pris dans le laboratoire du professeur Danuta Frackowiak de l'Institut de Physique de l'Université Technique de Poznan en Pologne.

Les divers échantillons ont tous été incorporés dans un film de PVA (milieu isotrope) dont certains ont subi une élongation en vue d'obtenir un milieu anisotrope (voir section 2.5). Le film de PVA a la caractéristique d'être transparent dans la région d'absorption des pigments chlorophylliens et apporte un degré d'orientation du matériel biologique investigué ici (61). L'utilisation, sur les échantillons, de lumière polarisée permet d'obtenir de l'information sur l'organisation des pigments dans l'appareil photosynthétique.

### **2.6.1. Spectres d'absorption**

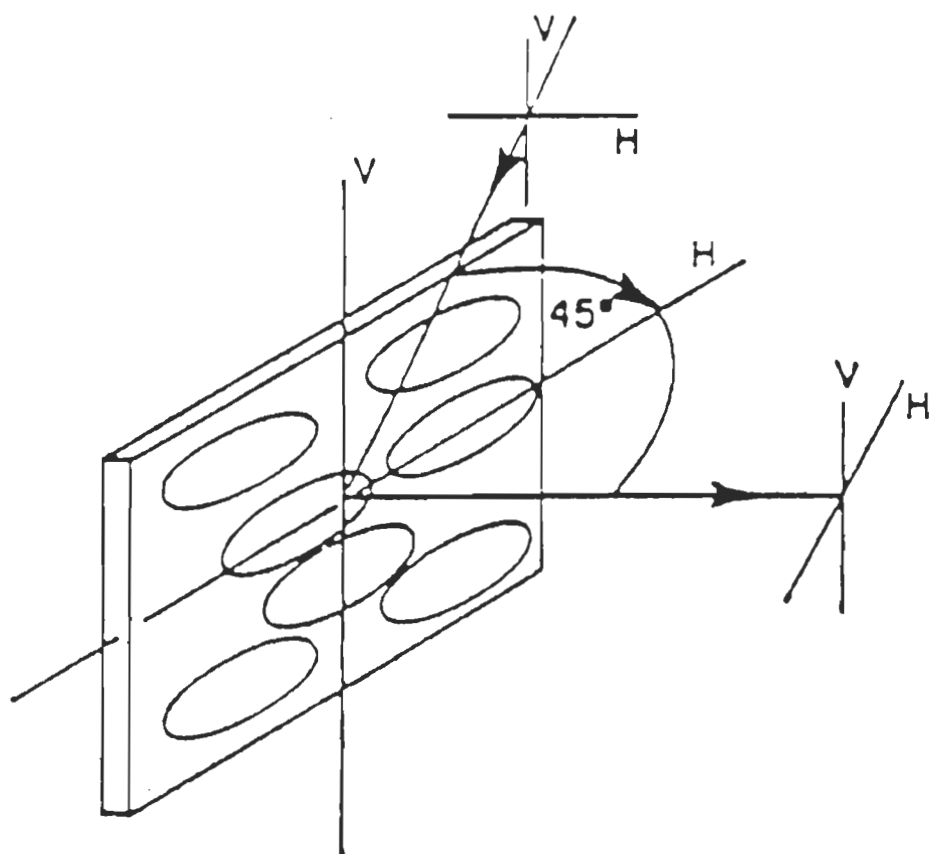
Les spectres d'absorption ont été enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre (Carl-Zeiss Jena. G.D.R. type Specord M-40 UV-VIS) équipé de supports pour échantillon et polarisateur. Un spectre d'absorption indiqué  $\parallel$  ou  $\perp$  signifie respectivement, une absorption en lumière polarisée parallèlement ou perpendiculairement à la direction de l'orientation de l'échantillon dans le film de PVA.

### **2.6.2. Spectres d'émission de fluorescence**

Les spectres d'émission de fluorescence ont été enregistré à l'aide d'un spectrofluorimètre (60). Pour les spectres d'émission polarisée, nous avons utilisé une notation composée de trois lettres pouvant être V-verticale et H-horizontale. La première lettre du trio sert à indiquer la polarisation du faisceau alors que la troisième indique la polarisation du faisceau d'émission. La lettre du centre indique la direction en regard de l'orientation de l'échantillon (figure 2.3).

### **2.6.3. Spectres photoacoustiques**

Les spectres photoacoustiques ont été mesurés à l'aide d'un spectromètre photoacoustique construit dans le laboratoire du professeur D. Frackowiak (60).



**FIGURE 2.3 :** Géométrie de la mesure d'émission de fluorescence polarisée

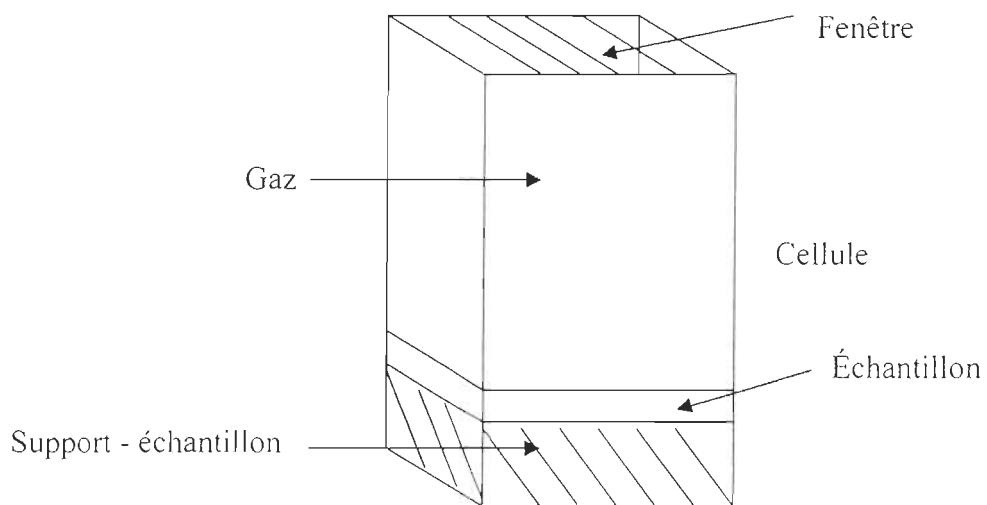
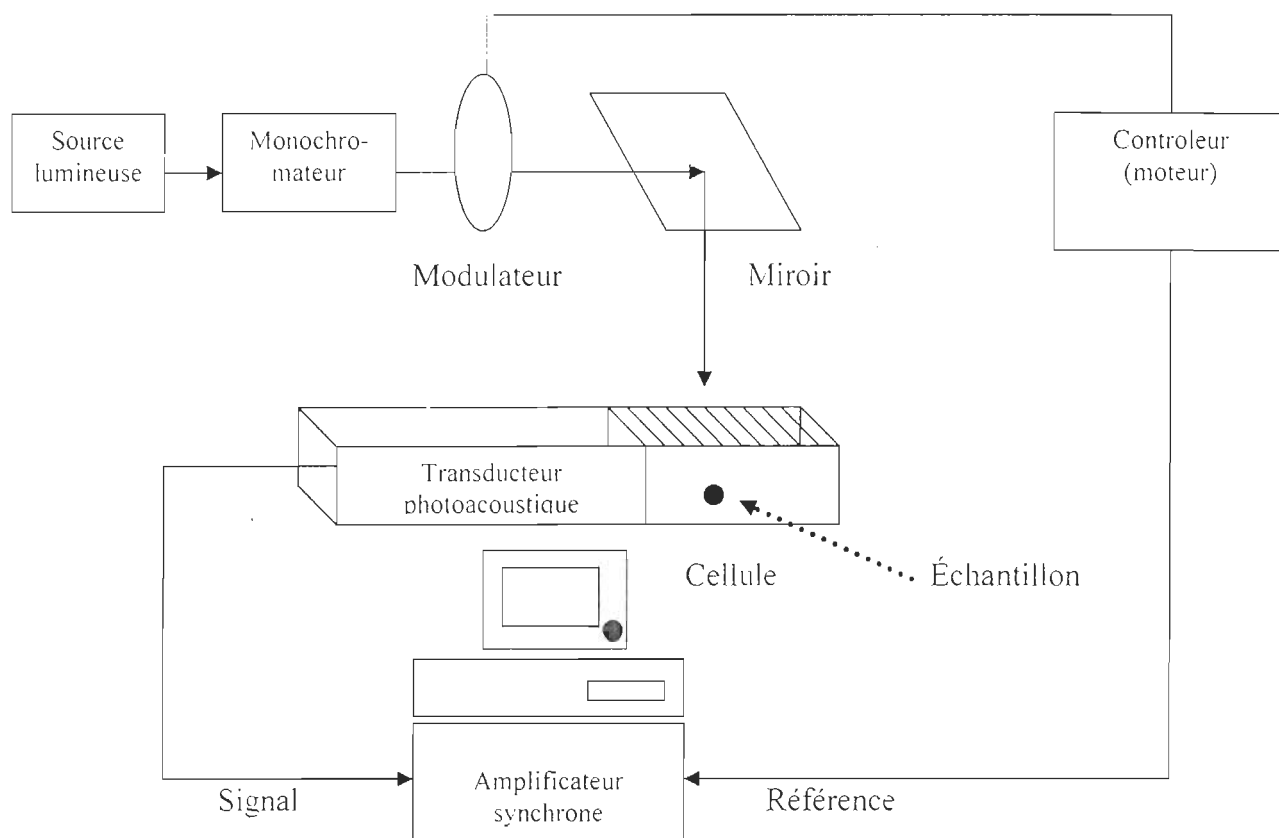
Les spectres photoacoustiques ont été mesurés à une fréquence de modulation de 30 Hz. Nous avons utilisé le noir de charbon pour corriger nos spectres. Lorsqu'un spectre était pris en lumière polarisée, alors nous le divisons par le spectre du noir de charbon pris également sous cette lumière polarisée (62).

Un spectre photoacoustique indiqué par  $\parallel$  ou par  $\perp$  signifie respectivement, une excitation avec une lumière de longueur d'onde donnée polarisée parallèlement ou perpendiculairement à la direction de l'orientation de l'échantillon dans le film de PVA.

#### **2.6.4. Principe de base de la spectroscopie photoacoustique**

La spectroscopie photoacoustique est une méthode basée sur la détection d'une production périodique de chaleur générée par un échantillon absorbant une radiation d'excitation modulée (63).

La figure 2.4 représente le spectromètre photoacoustique utilisé pour nos mesures. Une source lumineuse constituée par une lampe à arc au Xénon fournit la lumière d'excitation. Un monochromateur permet de sélectionner la longueur d'onde. La radiation d'excitation est modulée en intensité à une fréquence de 30 Hz à l'aide d'un modulateur de fréquence. L'échantillon repose dans la cellule de mesure. Cette cellule est scellée et est munie d'une fenêtre permettant la transmission de la radiation d'excitation (figure 2.4). Le signal photoacoustique est généré lorsque la radiation modulée est absorbée par l'échantillon ; celui-ci subit un réchauffement et un refroidissement périodiques qui vont amener des variations thermiques à l'interface échantillon-gaz. Le gaz (air) à l'intérieur de la cellule va subir ainsi des expansions et des contractions périodiques. Ce transfert d'énergie cinétique aux molécules de gaz agit comme un piston, c'est-à-dire induit des variations de pression dans le milieu. Comme la cellule est fermée, il est possible de détecter cette « onde de pression » à l'aide d'un microphone (transducteur acoustique). Nous mesurons alors un signal photoacoustique brut. Ce signal est pré-amplifié et analysé par un amplificateur synchrone qui mesure l'amplitude et la phase du signal en regard de la modulation de la radiation d'excitation. Les données sont par la suite traitées à l'aide d'un programme sur ordinateur.



**FIGURE 2.4 :** Schéma du spectromètre photoacoustique et de la cellule

### **2.6.5. La désactivation thermique**

Un des buts de notre étude était d'obtenir des valeurs de désactivation thermique (DT) de nos échantillons. Le rapport de l'intensité du signal photoacoustique à celui de l'intensité du spectre d'absorption permet d'obtenir ces valeurs. Le processus de désactivation thermique est l'un des trois modes qu'un chromophore utilise pour dissiper son énergie d'excitation ; les autres modes sont l'émission de fluorescence (F) et le transfert d'énergie d'excitation à une autre molécule (TE), et la réaction photochimique (61-62).

## 2.7 TRAITEMENT DES THYLACOÏDES ET DES PS II

Dans cette section, nous décrivons les traitements administrés au divers échantillons utilisés lors de l'étude de l'effet des anions sulfite et sulfate.

### 2.7.1. Traitement au sulfite

Pour tous les échantillons de PS II traités ou non, tous contenaient  $200 \mu\text{g Chl ml}^{-1}$  dans 1 ml d'une solution A, B, C ou D. La solution A était à un pH de 8.0 et servait aux traitements des PS II. La solution B servait alors de contrôle (pH 8.0). La solution C servait de contrôle à un pH 9.8. La solution D, de pH 9.8, servait aux traitements des PS II. Tous les échantillons étaient incubés à la noirceur pendant 1 h sous une faible agitation et à  $0^\circ\text{C}$ . Le tableau 2.4 résume la composition chimique de ces solutions et le chapitre 3 exploite ces données.

### 2.7.2. Traitement au sulfate

Pour tous les traitements des PS II, les échantillons contenaient  $200 \mu\text{g Chl ml}^{-1}$  dans 1 ml d'une solution consistant en : 0,4 M sucrose, 40 mM Mes à un pH de 6.0, 0.1% de digitonine et différentes concentrations de sulfate de sodium ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). Lorsque nécessaire pour notre étude, 10  $\mu\text{l}$  d'une préparation fraîche de  $\text{CaCl}_2$  étaient ajoutés à la solution. Tous les traitements ont été réalisés à  $25^\circ\text{C}$  et pendant 5 h. Après les traitements, les membranes étaient suspendues dans le milieu libre de sulfate. Les chapitres 4 et 5 traitent de ces données.

Pour les traitements des thylacoïdes, ceux-ci sont suspendus dans une solution composée de 10 mM Hepes à un pH de 6.5, 0.4 M sucrose, 5 mM  $\text{MgCl}_2$  et 50 mM de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  pour le traitement au sulfate. L'échantillon contrôle et les échantillons traités étaient incubés 1 h sur de la glace et à la noirceur sous une faible agitation. Après incubation, les échantillons sont mis en suspension deux fois dans le milieu libre de sulfate avant d'être incorporés dans un film de PVA. Le chapitre 5 traite de ces données.

TABLEAU 2.4

Composition chimique des solutions utilisées  
lors des traitements des PSII au sulfite ou  
lors des contrôles.

Solution A (traitements)	
Hepes (pH 8.0)	40 mM
Sucrose	0,4 M
NaCl	10 mM
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	x mM*
Solution B (contrôle)	
Mes (pH 8.0)	40 mM
Sucrose	0,4 M
NaCl	10 mM
Solution C (contrôle)	
Glycine (pH 9.8)	40 mM
Sucrose	0,4 M
NaCl	10 mM
Solution D (traitements)	
Glycine (pH 9.8)	40 mM
Sucrose	0,4 M
NaCl	10 mM
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	x mM*

\* Différentes concentration de sulfite de sodium étaient utilisées.

## CHAPITRE 3

### EXTRACTION DES PROTÉINES EXTRINSÈQUES DE 33, 23 ET 18 kDa DU PHOTOSYSTÈME II PAR TRAITEMENT AU SULFITE À UN pH ALCALIN

#### 3.1 RÉSUMÉ

Nous avons trouvé que l'incubation de membranes enrichies en PSII en présence de sulfite peut induire une perte sélective des polypeptides de 18, 23 et 33 kDa appartenant au complexe d'émission d'oxygène. Lorsque le traitement au sulfite est fait à un pH de 8.0, les protéines de 18 et 23 kDa sont enlevées efficacement du complexe. Sous les mêmes conditions, le polypeptide de 33 kDa demeure lié, même lorsque 2 M de sulfite de sodium est utilisé. Cependant, dans des conditions plus alcalines (pH 9.8), nous observons une perte importante de la 33 kDa en présence d'une faible concentration en sulfite (50 mM). Cette extraction sélective des polypeptides de 18, 23 et 33 kDa du PSII nous amène à interpréter la nature du lien entre la 33 kDa et le complexe du PSII, soit la présence de forces électrostatiques et de liens hydrogènes.



### 3.2 INTRODUCTION

La protéine extrinsèque de 33 kDa du complexe d'émission d'oxygène du PSII a un rôle plus important à jouer dans l'émission d'oxygène que les polypeptides de 18 et 23 kDa (30, 64-65). L'enlèvement de cette sous-unité de 33 kDa cause la perte de l'activité du complexe qui ne peut pas être entièrement restaurée (66-69). Ce polypeptide semble être lié directement au cœur du complexe du PSII, tandis que les sous-unités de 18 et 23 kDa semblent être ancrées au PSII via la protéine de 33 kDa (64, 68). Les propriétés liantes de la protéine de 33 kDa au photosystème II ne sont pas encore tout à fait claires. Il a été suggéré que le lien entre la sous-unité de 33 kDa et le photosystème II repose sur : une interaction hydrophobique (64), des ponts hydrogènes (30, 42) ou une attraction électrostatique (68). Cependant, dans ces études, l'interprétation des propriétés liantes peut dépendre des méthodes utilisées pour enlever la protéine de 33 kDa. Dans notre étude, en utilisant un traitement au sulfite pour enlever la 33 kDa, nous obtenons un nouveau témoignage concernant ses propriétés liantes avec le PSII.

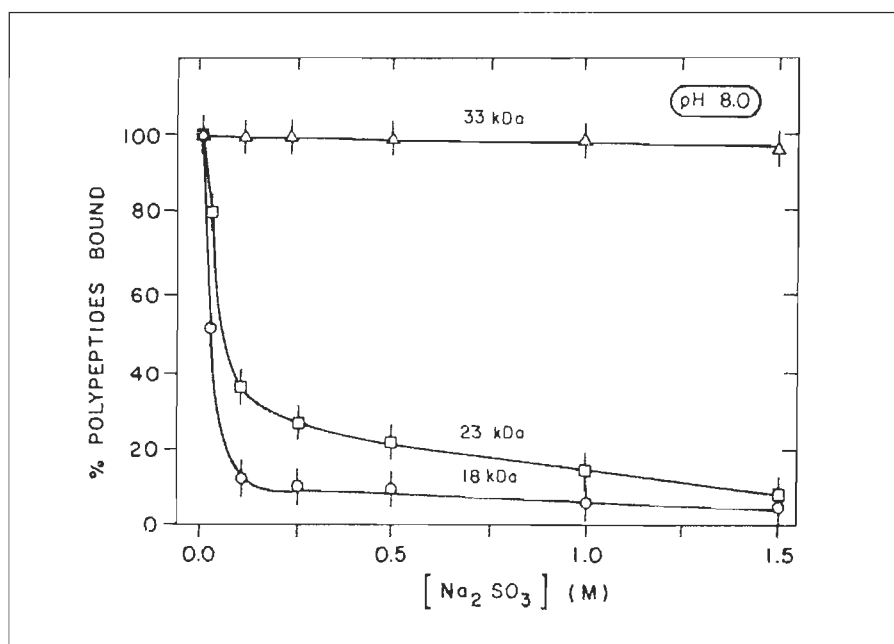
### 3.3 RÉSULTATS ET DISCUSSION

La figure 3.1 montre l'étendue de l'enlèvement des protéines de 18 et 23 kDa après l'incubation des membranes enrichies en photosystème II avec du sulfite à un pH de 8.0. La perte de ces sous-unités progresse rapidement jusqu'à une concentration de 0.1 M. A cette concentration, seulement 35% de la sous-unité de 23 kDa et 10% de la sous-unité de 18 kDa demeurent liés au complexe du photosystème II. Cependant la quantité relative de la sous-unité de 33 kDa liée à la membrane n'est pas affectée par le traitement au sulfite ; même à 2 M de sulfite de sodium (donnée non montrée).

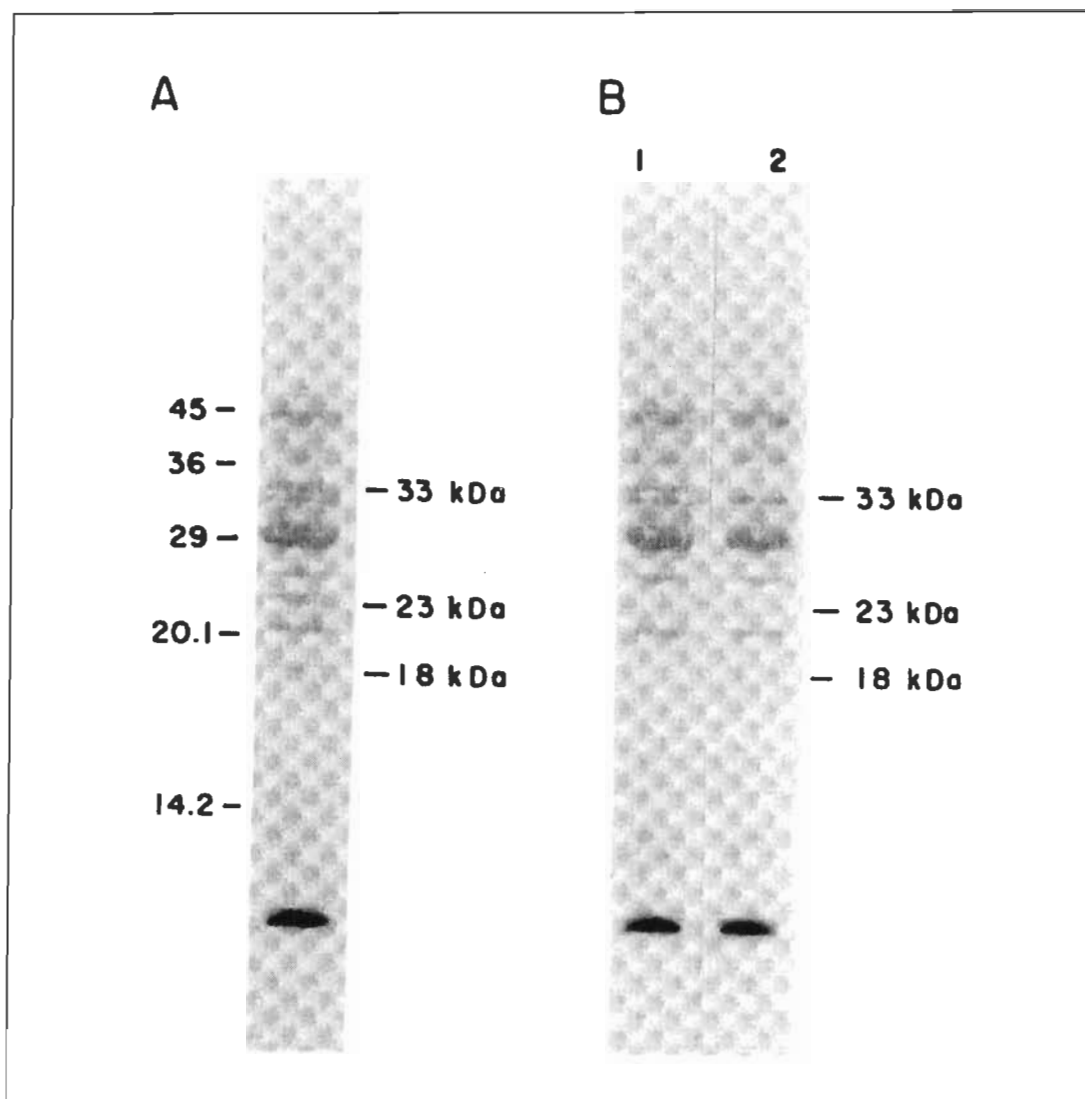
L'enlèvement des protéines de 18 et 23 kDa par traitement avec forte concentration en NaCl a été interprété comme étant la neutralisation des forces électrostatiques entre ces protéines et le complexe du photosystème II (64-65, 70). L'enlèvement de ces sous-unités, induit par la présence de sel de sulfite, que nous avons observé, supporte cette interprétation. La quantité inchangée de la sous-unité de 33 kDa dans les membranes enrichies en photosystème II incubées avec du sulfite nous indique que les forces électrostatiques seules ne peuvent pas expliquer la nature du lien entre cette protéine et le photosystème II.

L'effet de l'incubation au sulfite des membranes enrichies en PSII à un pH de 9.8 a été étudié sur gel d'électrophorèse.

La figure 3.2A présente un échantillon contrôle après séparation des protéines dans le photosystème II. Les trois bandes de protéines indiquées par 33, 23 et 18 kDa ont été identifiées par des méthodes standards (30, 64, 68) et sont associées au complexe d'émission d'oxygène du photosystème II.



**FIGURE 3.1 :** Effet de l'incubation au sulfite à un pH de 8.0 des complexes du PSII.



**FIGURE 3.2** : Effet du traitement au sulfite à un pH de 9.8 sur les PSII.  
 La figure A montre la composition intacte en protéines de l'échantillon contrôle de PSII. La ligne 1 à la figure B représente la composition en protéines des PSII traités à un pH de 9.8 sans sulfite tandis que la ligne 2 de la figure B représente l'effet du traitement au sulfite (50 mM) à un pH de 9.8.

L'effet de l'incubation au sulfite à un pH de 9.8 sur les polypeptides du photosystème II est montré à la figure 3.2B. L'échantillon contrôle incubé à un pH de 9.8 dans un milieu sans sulfite est analysé à la ligne 1, tandis que l'effet du traitement au sulfite (50 mM) est analysé à la ligne 2. Le gel d'électrophorèse présenté à la ligne 2 nous indique que l'incubation au sulfite des membranes enrichies en photosystème II à un pH de 9.8 mène à la perte des sous-unités de 18, 23 et 33 kDa associées au complexe d'émission d'oxygène du photosystème II. Cependant, nous observons qu'un haut pH utilisé seul permet l'enlèvement des polypeptides de 18 et 23 kDa, mais laisse la protéine de 33 kDa entièrement liée.

L'effet du sulfite à un pH de 9.8 semble ainsi enlever seulement la sous-unité de 33 kDa. L'enlèvement de cette protéine de 33 kDa à un pH de 9.8 se réalise à une faible concentration en sulfite (50 mM). Ceci nous indique que le polypeptide de 33 kDa montre une grande sensibilité au sulfite lorsque l'incubation a lieu à un pH de 9.8. Le fait qu'aucun enlèvement de la sous-unité de 33 kDa ne se constate lorsque l'incubation au sulfite est faite à un pH de 8.0 (voir figure 3.1) nous indique que le sulfite et un haut pH sont nécessaires pour enlever la protéine de 33 kDa.

L'existence de ponts hydrogènes entre le polypeptide de 33 kDa et le cœur du complexe du PSII a été proposée précédemment par Franzen et Andreasson en 1983 (42), tandis Ono et Inoue suggèrent la contribution d'attraction électrostatique (68). Dans notre étude, la perte de la sous-unité de 33 kDa peut être dépendante du bris des ponts hydrogène par incubation à un pH élevé. En plus d'un pH élevé, l'exigence en sulfite pour la perte de la protéine de 33 kDa indique que des forces électrostatiques sont aussi impliquées dans la liaison de cette protéine. Il n'apparaît pas que des interactions hydrophobiques (64) contribuent à la liaison de la protéine de 33 kDa au complexe du PSII.

## **CHAPITRE 4**

### **INHIBITION AU SULFATE DU COMPLEXE D'ÉMISSION D'OXYGÈNE DU PHOTOSYSTÈME II**

#### **4.1 RÉSUMÉ**

L'effet du sulfate sur l'émission d'oxygène chez des membranes enrichies en PSII d'orge est étudié. Les membranes purifiées, à partir de l'orge, ont été exposées à l'effet du sulfate dans le noir et sous une faible illumination. La présence de 10 mM de  $\text{CaCl}_2$  pendant le traitement au sulfate prévient la perte d'émission d'oxygène. La protection est complète même à une concentration de 50 mM en  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Cependant, la lumière stimule l'inhibition au sulfate de l'émission d'oxygène par les PSII. Après incubation avec le sulfate, nous avons observé une perte chez les polypeptides de 18 et 23 kDa du complexe du PSII. Nous fournissons dans cette étude de nouvelles observations concernant la perte d'émission d'oxygène suite au traitement au sulfate qui peut être causé par la perte des ions chlorure et calcium du complexe d'émission d'oxygène plutôt que par la perte partielle des polypeptides de 18 et 23 kDa de ce complexe.

## 4.2 INTRODUCTION

Des études intensives ont été réalisées sur les effets du  $\text{SO}_2$  sur le processus physiologique des plantes (1-5). Les réactions lumineuses de la photosynthèse sont connues comme étant une cible sensible de l'effet inhibiteur du  $\text{SO}_2$  (6-9). Le  $\text{SO}_2$  absorbé par les feuilles est converti en anions bisulfite, sulfite, et sulfate dans les cellules végétales (9-11). Il est connu que l'anion sulfate s'accumule dans le cytosole de la plante. Quelques expériences démontrent qu'après fumigation au  $\text{SO}_2$ , le sulfate est difficilement éliminé des cellules (10, 12). L'accumulation de sulfate dans la cellule devrait amener la présence de sulfate dans les chloroplastes (13). Bien que le sulfate interfère avec l'activité du chloroplaste, le site de son action dans la membrane du chloroplaste n'est pas précisément identifié (9, 11). Il y a quelques indications montrant que le PSII pourrait être sensible à l'accumulation du sulfate dans les chloroplastes (71). Dans cette étude, nous essayons de caractériser et de localiser l'effet du sulfate sur le PSII. Nous avons des membranes enrichies en PSII pour étudier les effets du sulfate sur les composantes structurelles et fonctionnelles du complexe du PSII. Prenant en considération les données précédemment rapportées sur le  $\text{SO}_2$ , nous fournissons un nouveau témoignage concernant l'effet du sulfate sur l'activité du PSII comme pouvant être une part de l'effet du  $\text{SO}_2$  sur les plantes.

### 4.3 RÉSULTATS

L'émission d'oxygène des particules de PSII a été mesurée après 5 heures d'incubation à la noirceur ou sous une faible illumination avec différentes concentrations en sulfate.

La figure 4.1 montre l'effet du sulfate sur l'émission d'oxygène mesurée après incubation à la noirceur. La présence de 10 mM de  $\text{CaCl}_2$  pendant les traitements prévient la perte d'émission d'oxygène. La protection est complète même à une concentration de 50 mM en  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . En absence de  $\text{CaCl}_2$ , l'inhibition de l'émission d'oxygène par le sulfate est évidente. À 50 mM en sulfate, seulement 40% d'émission d'oxygène demeure comparé à l'échantillon contrôle.

L'effet de la lumière sur l'inhibition au sulfate est étudié en exposant l'échantillon à un faisceau de lumière ( $1 \text{ mW/cm}^2$ ) pendant les traitements au sulfate. Une faible illumination est utilisée afin d'éviter la photoinhibition de l'activité du PSII.

La figure 4.2 montre l'effet des traitements au sulfate avec illumination sur l'émission d'oxygène. Les résultats démontrent l'effet inhibiteur du sulfate que ce soit en absence ou en présence de 10 mM de  $\text{CaCl}_2$ . L'inhibition de l'émission d'oxygène par les traitements au sulfate en présence de 10 mM de  $\text{CaCl}_2$  est de 15% comparé à l'échantillon contrôle. Cependant, en absence de  $\text{CaCl}_2$ , le taux d'émission d'oxygène est inhibé de 95% comparé au contrôle.



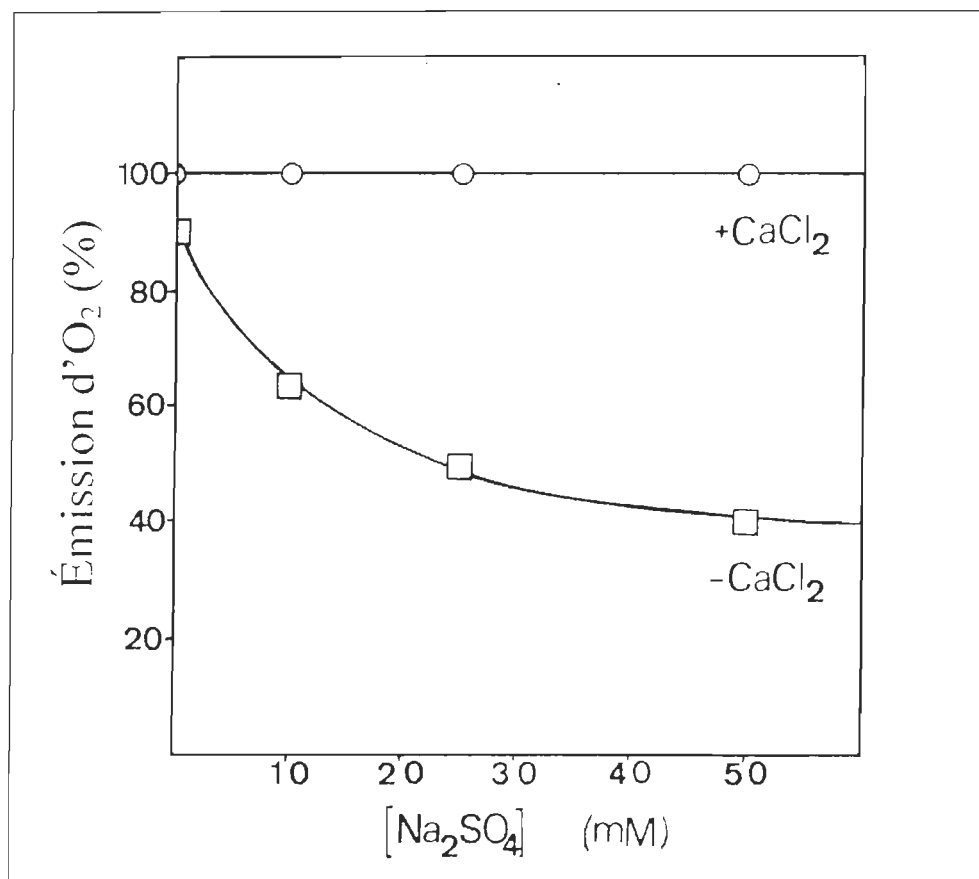


FIGURE 4.1 : Inhibition au sulfate des particules de PSII. L'émission d'oxygène des particules de PSII incubées en présence de 10 mM de CaCl<sub>2</sub> (cercles) ou en absence de CaCl<sub>2</sub> (carrés) pendant le traitement au sulfate.

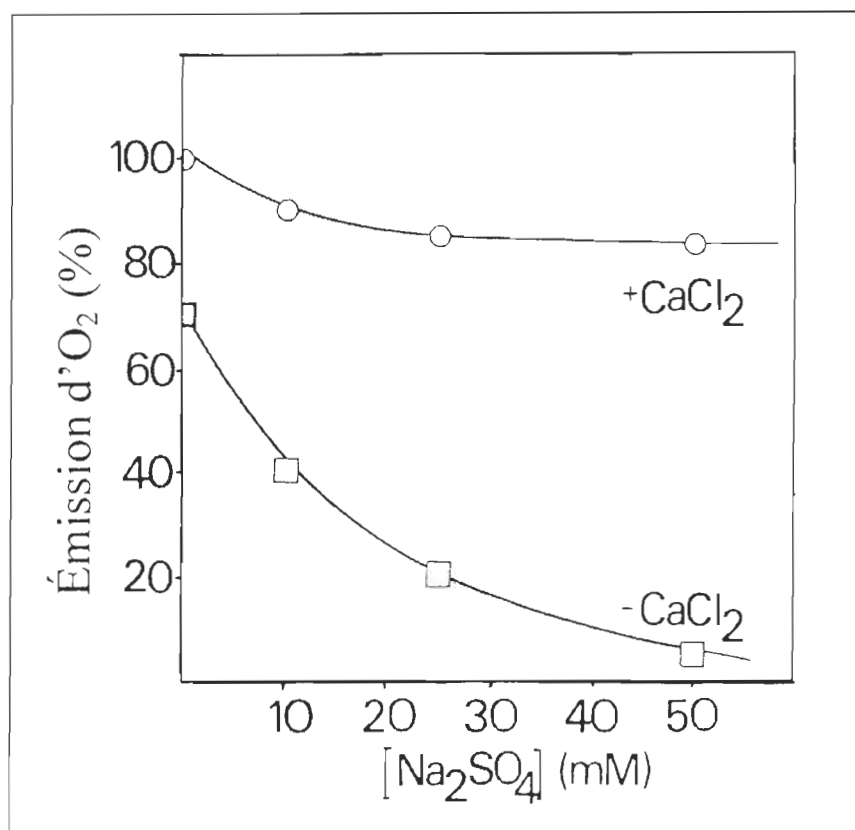


FIGURE 4.2 . Effet de la lumière sur l'inhibition au sulfate de l'émission d'oxygène des PSII.  
 Les échantillons de PSII ont été traités avec une faible illumination.  
 L'émission d'oxygène des PSII incubés avec 10 mM de CaCl<sub>2</sub> (cercles) ou sans CaCl<sub>2</sub> (carrés) pendant le traitement.

Pour localiser l'effet du sulfate sur la structure du PSII, nous avons étudié la composition en polypeptides après les traitements au sulfate.

La figure 4.3 montre les densitogrammes des bandes de protéines colorées séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Le profil de l'échantillon contrôle est montré à la figure A, tandis que l'échantillon avec 50 mM en sulfate est présenté à la figure B. La comparaison des densitogrammes démontre une perte relative des polypeptides de 18 et 23 kDa après les traitements. Il semble que le sulfate affecte directement le système d'émission d'oxygène puisque ces deux polypeptides font partie du complexe d'émission d'oxygène du PSII.

La Tableau 4.1 montre la perte de ces protéines évaluée à partir des densitogrammes pour chaque concentration de sulfate utilisée. Nous constatons aucune perte de polypeptides pour des concentrations inférieures à 25 mM en sulfate. L'étendue des pertes de ces deux protéines demeure inchangée, que le  $\text{CaCl}_2$  soit présent ou non pendant l'incubation; ni même la présence de lumière n'affecte les pertes observées (données non montrées). Ces résultats démontrent que la perte des polypeptides de 18 et 23 kDa du complexe du PSII n'inhibe pas fortement l'émission d'oxygène si 10 mM de  $\text{CaCl}_2$  est présent pendant l'incubation, mais fortement en absence de  $\text{CaCl}_2$ .

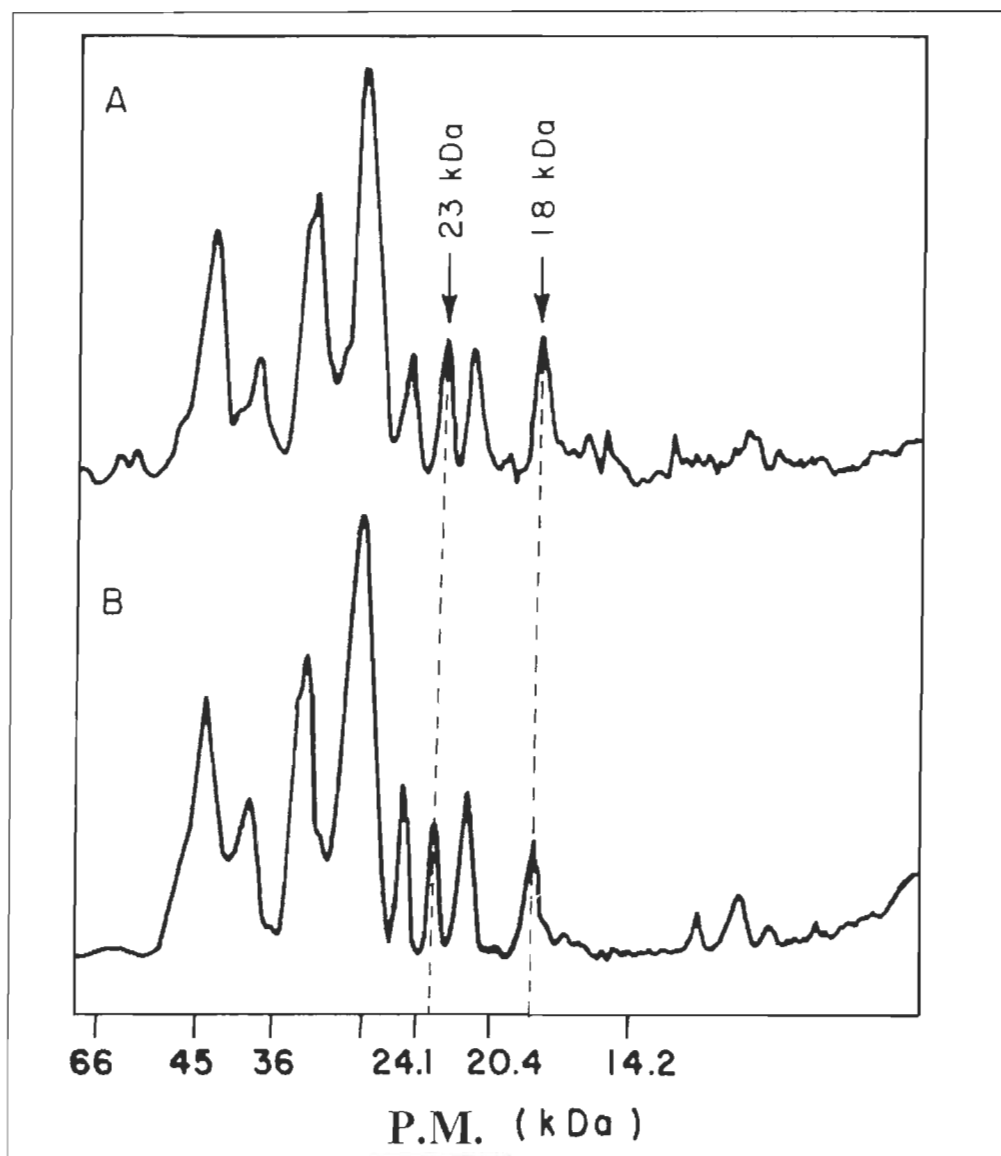


FIGURE 4.3 : Perte en polypeptides dans le complexe du PSII par incubation des particules de PSII en présence de sulfate.  
 A) Densitogramme de l'échantillon contrôle :  
 B) Densitogramme des particules de PSII traitées avec 50 mM de sodium de sulfate (sans  $\text{CaCl}_2$  et sans lumière).

TABLEAU 4.1

Effet de l'incubation au sulfate sur les protéines de 23 kDa et 18 kDa.

[Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ], mM	18 kDa, %	23 kDa, %
0	100	100
10	100	100
25	80	90
50	40	65

La figure 4.4 représente la comparaison des données sur l'émission d'oxygène du PSII et les taux de perte des protéines de 18 et 23 kDa affectées par les traitements au sulfate. Il est évident qu'il n'y a pas une interdépendance complète entre l'inhibition de l'émission d'oxygène et le taux de perte en polypeptides du PSII causé par l'incubation au sulfate. Cela indique la complexité des effets du sulfate sur les fonctions et la structure des composantes du PSII.

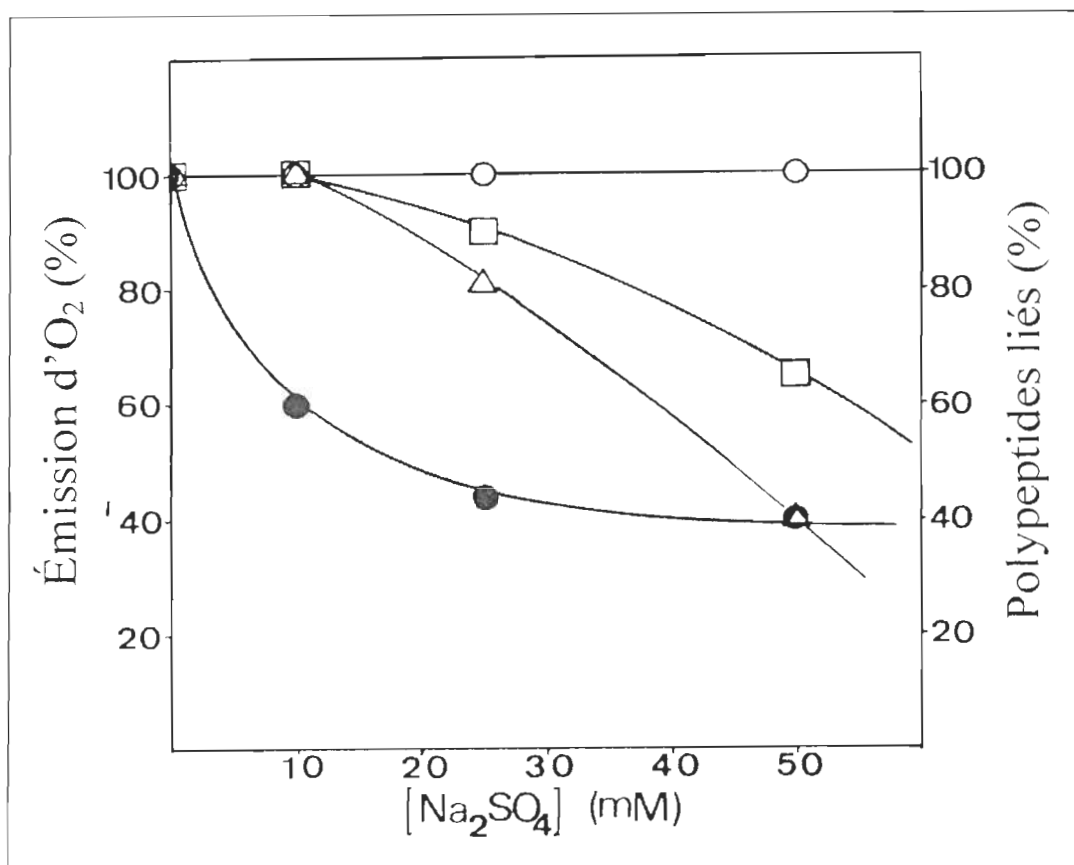


FIGURE 4.4 : Comparaison de la perte en polypeptides avec l'inhibition de l'émission d'oxygène par les particules de PSII. L'émission d'oxygène après le traitement au sulfate est désignée par les cercles noirs. Les cercles ouverts représentent l'émission d'oxygène des PSII traités avec le sulfate en présence de 10 mM de  $\text{CaCl}_2$ . Les carrés représentent le pourcentage de la protéine de 23 kDa liée au PSII et les triangles indiquent le pourcentage de la protéine de 18 kDa qui reste liée après le traitement au sulfate.

#### 4.4 DISCUSSION

Dans notre étude, nous avons observé l'inhibition de l'émission d'oxygène chez les PSII par le sulfate. Cette inhibition est augmentée par la lumière, mais moindre en présence de  $\text{CaCl}_2$ . Il a été rapporté précédemment que la lumière peut stimuler la compétition du sulfate avec les ions chlorure pour le site de liaison du chlorure dans le complexe du PSII (71-72). Il semble que l'addition de 10 mM de  $\text{CaCl}_2$  fournit suffisamment de chlorure pour compétitionner avec le sulfate et maintenir l'activité du complexe d'émission d'oxygène. Dans un rapport, il a été mentionné que le statut protecteur du chlorure tient de son influence sur la structure du complexe d'émission d'oxygène. (73).

De plus, nous observons une perte des polypeptides de 18 et 23 kDa dans le complexe du PSII après 5 h d'incubation avec une concentration en sulfate supérieure à 10 mM. Ces polypeptides font partie tous les deux du complexe d'émission d'oxygène et sont attachés à la surface interne de la membrane photosynthétique. Ils peuvent être facilement enlevés de la membrane par traitements avec de haute concentration en sels (68, 74). Il semble ainsi que l'incubation au sulfate libère les protéines en augmentant la force ionique du milieu. La perte des polypeptides de 18 et 23 kDa du complexe du PSII résulte en une diminution de l'émission d'oxygène (75-76). Il est supposé que le rôle de ces deux polypeptides soit de fournir la concentration nécessaire en chlorure et en calcium pour les fonctions du PSII (76-77). La perte de ces polypeptides « concentrateurs » en chlorure et calcium va conséquemment décroître la concentration en ions près du PSII ; ils peuvent ainsi participer à l'inhibition de l'émission d'oxygène. (78). Notre étude indique que l'inhibition au sulfate de l'émission d'oxygène est induite par la perte des ions chlorure et calcium étroitement associée avec le PSII plutôt que la perte partielle des polypeptides de 18 et 23 kDa.

## 4.5 CONCLUSION

Nous concluons que les traitements au sulfate des PSII peuvent induire deux effets reliés au complexe d'émission d'oxygène. Le premier est l'inhibition de l'activité d'émission d'oxygène dépendant des ions chlorure et calcium. Cette inhibition est stimulée par la lumière et contenue par la présence de 10 mM en  $\text{CaCl}_2$ . Le second effet du sulfate sur les PSII, démontré pour la première fois, est la perte partielle des polypeptides de 18 et 23 kDa du complexe d'émission d'oxygène. Conséquemment, ces conclusions contribuent à expliquer quelques observations antérieures sur les effets du sulfure sur les plantes dans des conditions *in vivo*. Il a été observé pour les plantes exposées au  $\text{SO}_2$  que le sulfate accumulé dans le cytosol ne peut pas être facilement éliminé (10, 12). Les chloroplastes isolés de plants traités avec du  $\text{SO}_2$  montrent une faible activité du système d'émission d'oxygène (4). Il a été rapporté que l'addition de chlorure aux chloroplastes isolés et traités au  $\text{SO}_2$  peut permettre de recouvrer l'activité en émission d'oxygène (8). Par conséquent, nos données sur l'inhibition au sulfate de l'émission d'oxygène et le rôle protecteur du  $\text{CaCl}_2$  sont en accord avec ces rapports.



## CHAPITRE 5

### INFLUENCE DU SULFATE SUR LES SPECTRES POLARISÉS DES THYLACOÏDES

#### 5.1 RÉSUMÉ

Les spectres d'absorption, de fluorescence et de photoacoustique de thylacoïdes traités et non traités avec du sulfate ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) et incorporés dans un film d'alcool de polyvinyle ont été mesurés. Les échantillons orientés de manière isotrope et selon un seul axe par étirement du film ont été étudiés en utilisant une radiation naturelle et polarisée. Le rendement en désactivation thermique de l'énergie absorbée par les pigments photosynthétiques augmente fortement suite au traitement par le sulfate. Le rendement du transfert de l'énergie d'excitation entre les pigments antennes dans les thylacoïdes traités au sulfate diminue.

## 5.2 INTRODUCTION

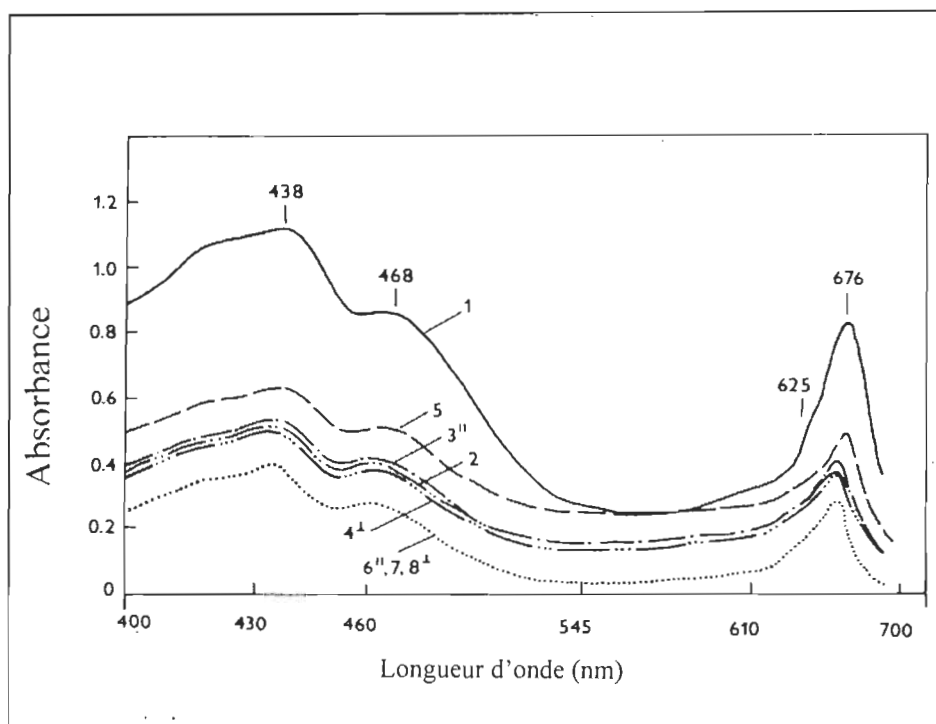
Les réactions lumineuses de la photosynthèse sont des cibles sensibles aux effets inhibiteurs du sulfate (80). Diverse méthodes spectrales peuvent être utilisées dans le diagnostic des effets des polluants (9). Beauregard et coll. (70) ont trouvé que l'incubation au sulfate des membranes photosynthétiques induit deux effets reliés au complexe d'émission d'oxygène : (1) Inhibition de l'activité en émission d'oxygène et (2) Une perte partielle des polypeptides de 18 et 23 kDa du complexe du PS II. Ces deux effets peuvent expliquer l'observation de Shimazaki et coll. (80) concernant des chloroplastes isolés de plantes traitées au sulfate et démontrant une faible activité en émission d'oxygène. La présence d'ions chlorure diminue la perte d'émission d'oxygène causée par le sulfate (70) ; ce qui pourrait s'expliquer par des effets stabilisateurs de ces ions sur les polypeptides de 18 et 23 kDa. Les ions  $\text{Cl}^-$  et  $\text{Ca}^{2+}$  exhibent tous les deux des interactions spécifiques avec le complexe du PS II impliqué dans le processus d'émission d'oxygène, mais l'apport de chacun des ions est différent (81-82).

Dans cette partie de l'étude, les spectres polarisés de thylacoïdes traités et non traités au sulfate et incorporés dans des films de polymère, sont comparés pour voir comment le traitement influence la structure de la membrane du thylacoïde et les interactions mutuelles entre les pigments antennes.

### 5.3 RÉSULTATS ET DISCUSSION

L'étirement d'un film de PVA contenant un échantillon de thylacoïdes entraîne un décalage de la bande d'absorption rouge vers des longueurs d'onde plus petites (figure 5.1). Le traitement au sulfate agit de manière similaire (figure 5.1, courbes 1 et 5). Le maximum d'absorption relié à la chlorophylle b dans tous les échantillons est situé dans la région 467-468 nm. Le ratio de la bande rouge à la bande de Soret est changé légèrement suite à l'étirement du film ou du traitement au sulfate. Les thylacoïdes sont déformés par l'élongation du film (83). À cause de cette déformation, divers complexes pigment-protéine peuvent être orientés différemment en regard du plan du film. Une telle explication semble plausible puisque les composantes parallèle et perpendiculaire des pics d'absorption dans le rouge sont mutuellement décalées (figure 5.1).

La forme des PAS du même ensemble d'échantillon diffère des spectres d'absorption par un ratio plus élevé de la bande rouge à la bande de Soret (figure 5.2). Un effet similaire observé par Wrobel et Hendrich (61) peut être expliqué par les orientations différentes des divers complexes.; un bassin de molécules contribue davantage au pic rouge, tandis qu'un autre contribue à la bande de Soret. Les moments de transition (TM) d'absorption de la chlorophylle a dans la bande rouge montrent une prédominance du type  $Q_y$ , tandis que la bande de Soret est une superposition des transitions  $B_x$  et  $B_y$  (28). Dans les divers complexes de chlorophylle, les TM sont projetés différemment dans le plan du vecteur électrique du faisceau, et par conséquent, divers complexes contribuent différemment aux bandes d'absorption dans le rouge et de Soret. Dans le même bassin de molécules, la conversion interne de l'état  $S_2$  à l'état  $S_1$ , induits par l'absorption d'un photon bleu et d'un photon rouge respectivement, est très efficace, et par conséquent, on s'attend à ce que le rendement en désactivation thermique (TD) soit plus élevé dans la bande de Soret que dans la bande rouge.

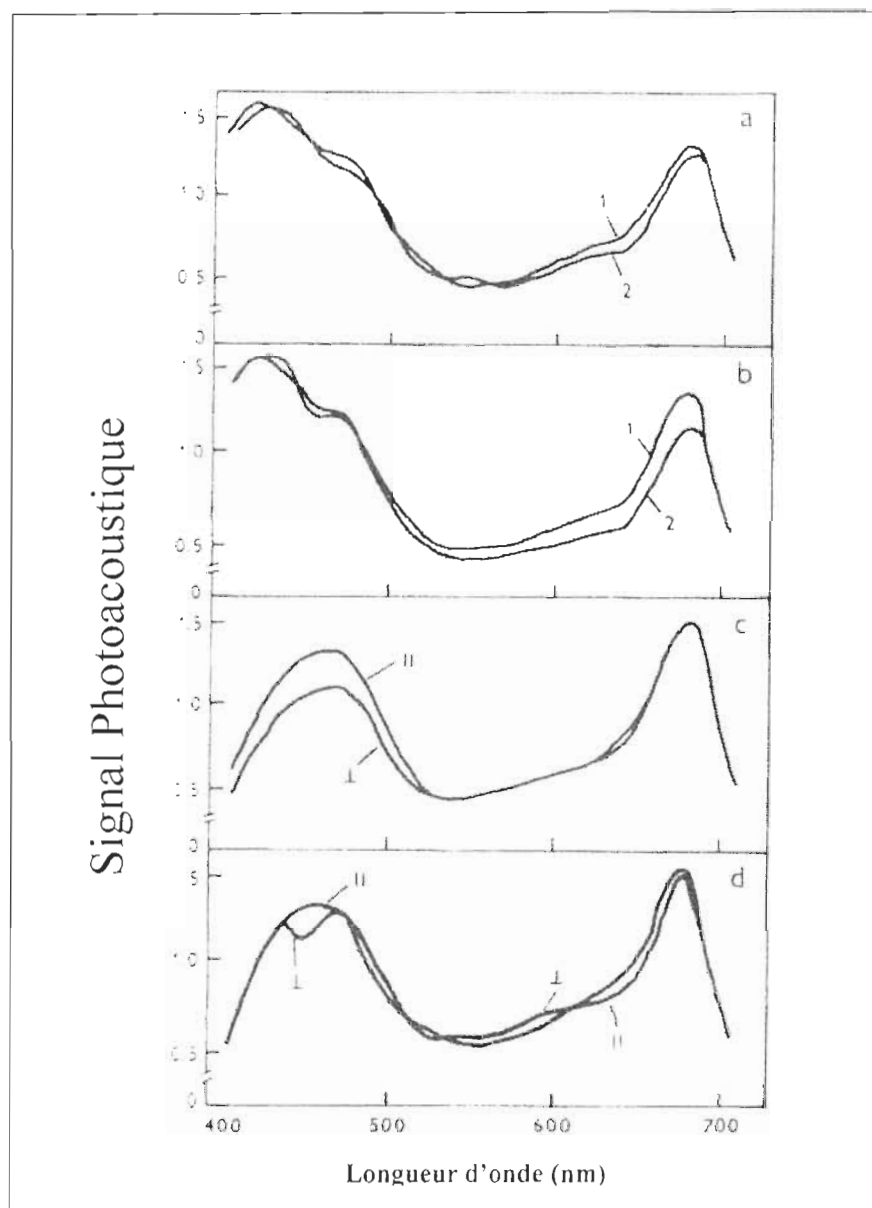


**FIGURE 5.1 :** Spectres d'absorption des thylacoïdes incorporés dans des films de PVA :

Courbes 1, 5 - échantillons dans film non étiré, non traité (1) et traités au sulfate (5).

Courbes 2, 3, et 4 - échantillons non traités et étirés (lumière naturelle et polarisée, la polarisation de la lumière est indiquée).

Courbes 6, 7, et 8 - échantillons traités au sulfate et étirés (lumière naturelle et polarisée).



**FIGURE 5.2** Spectres photoacoustiques de thylacoïdes dans des films de PVA.

- a - non étirés ;  
     courbe 1 – non traités ;  
     courbe 2 – traités ;
- b - étirés, lumière naturelle ;  
     courbe 1 – non traités ;  
     courbe 2 – traités ;
- c - non traités, étirés en lumière polarisée ;
- d – traités au sulfate, étirés en lumière polarisée.

La TD peut être définie comme le ratio du signal PAS à l'énergie absorbée. TD (en unité arbitraire), calculée à partir des spectres d'absorption et de PAS (Tableau 5.1), était plus élevée dans la bande rouge que dans la bande de Soret ; ce qui suggère une plus grande contribution à la bande rouge des complexes de Chl de type hautement « dissipatifs ».

Le rendement en fluorescence de la Chl b est plus petit que celui de la Chl a. Tout changement conformationnel amenant une modification de l'orientation et/ou de la distance entre ces pigments peut conduire à une diminution du rendement du transfert de l'énergie d'excitation de la Chl b à la Chl a. Par conséquent, il devrait y avoir une TD plus élevée dans la région d'absorption de la Chl b plutôt que dans la région de la Chl a. Sous un transfert d'énergie d'excitation efficace (ET) entre ces deux pigments, la valeur de la TD dans les deux régions d'absorption de la Chl a devrait être similaire. Comme démontré au tableau 5.1, l'étirement du film et l'ajout de sulfate perturbe le transfert d'énergie d'excitation entre la Chl b et la Chl a. Dans les régions de la Chl a (les bandes rouges et de Soret), l'étirement et le traitement au sulfate ont causé une augmentation des valeurs de TD mais ces deux effets ne sont pas équivalents. Dans l'échantillon étiré, mais non traité, les deux composantes polarisées de la TD sont différentes, tandis que dans les échantillons traités, ils sont identiques.

Les spectres d'émission de fluorescence non polarisés des thylacoïdes dans les films de PVA dépendent de la longueur d'onde d'excitation (figure 5.3, A et B). Les contributions des divers complexes de Chl changent avec les différentes régions d'excitation de la bande de Soret et dans le domaine des caroténoïdes. Le traitement au sulfate a une plus grande influence sur les échantillons non étirés que sur les échantillons étirés à une excitation dans la région de la bande de Soret. La différence est dû à l'effet de l'excitation dans le domaine d'absorption des caroténoïdes. Dans les échantillons étirés, le traitement améliore le transfert d'énergie d'excitation des caroténoïdes à la chlorophylle. Les contributions à l'émission provenant des complexes PS I (émettant dans une région de longueur d'onde plus longue) sont plus élevées dans les échantillons non traités que traités. Les différences entre les deux composantes polarisées d'émission de fluorescence dans les films étirés (figure 5.3 C, D) sont plus grandes que dans les échantillons traités et excités à 436 et 530 nm (dans les régions d'absorption du PS I + PS II et des caroténoïdes) (figure 5.3).

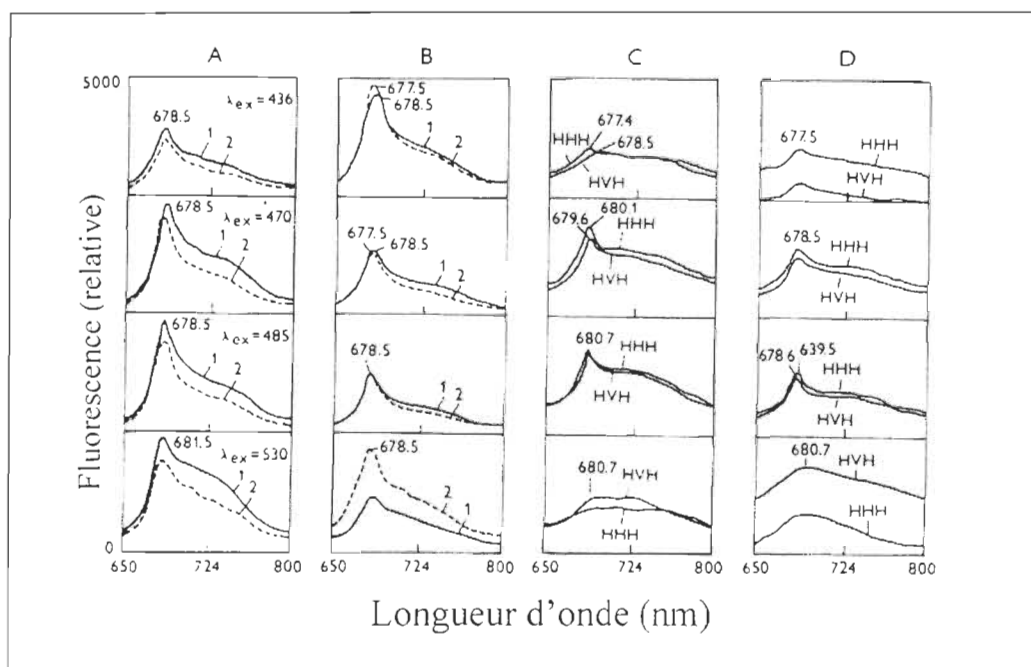
Dans le premier cas, la composante parallèle d'émission est plus élevée que dans celle perpendiculaire: dans le second cas, la situation est inversée. Les formes des spectres de fluorescence polarisés à divers niveaux d'excitation sont différentes, mais à cause d'une faible intensité d'émission et quelques effets secondaires, ces formes ne peuvent pas être analysées en détail ici.

**TABLEAU 5.1**

Désactivation thermique (TD) de thylacoïdes (TH)  
dans des films non étirés (u) et étirés (s). n – lumière naturelle.

Échantillon	Film	Polarisation	Longueur d'onde de la mesure de TD [nm]				
			425	436	468	650	676
non traité	u	n	1.48	1.36	1.47	2.14	1.63
traité	u	n	2.27	2.24	2.21	2.34	2.55
non traité	s	n	2.98	2.78	3.41	4.14	4.03
traité	s	n	4.75	4.41	5.17	5.04	4.69
non traité	s		1.47	2.13	3.51	4.05	4.28
		⊥	1.30	1.83	3.09	4.05	4.54
traité	s		2.56	3.34	5.21	7.50	6.56
		⊥	2.56	3.34	5.21	7.07	6.61





**FIGURE 5.3 :** Spectres de fluorescence (A, B) et de fluorescence polarisée (C, D) de thylacoïdes incorporés dans un film de PVA non étiré (A) ou étiré (B, C, D) sous diverses longueurs d'onde d'excitation (436 nm à 530 nm du haut vers le bas). Les échantillons non traités (courbe 1 en A et B, toutes les courbes en C) ou les échantillons traités avec le sulfate (courbe 2 en A, et B, toutes les courbes en D). HHH et HVH désignent les composantes horizontale et verticale de l'émission de fluorescence polarisée.

## 5.4 CONCLUSION

Ainsi nous pouvons conclure :

- (1) L'ajout de sulfate et l'étirement par film affectent la structure de l'appareil photosynthétique, mais les effets sont différents.
- (2) Le traitement au sulfate cause une forte croissance dans la TD (désactivation thermique) des molécules de pigment excitées. Cet effet est partiellement relié à la perturbation du transfert de l'énergie d'excitation entre les divers pigments. L'accroissement de la TD démontre qu'une grande part de l'énergie absorbée ne peut pas atteindre les centres réactionnels.
- (3) L'influence du sulfate sur l'organisation des caroténoïdes est particulièrement prononcée. La texture du bassin de caroténoïdes des échantillons traités et non traités est différente.

## CONCLUSION

Dans ce travail de recherche, les observations obtenues à partir des diverses mesures prises permettent de dégager les points suivants :

### 1. Concernant l'effet du sulfate

- i. Le sulfate inhibe l'activité des membranes (dégagement d'oxygène)
- ii. La présence de lumière pendant les traitements au sulfate stimule cette inhibition.
- iii. La présence de chlorure de calcium pendant les traitements au sulfate à la noirceur a permis de protéger l'activité en dégagement d'oxygène.
- iv. La présence de chlorure de calcium pendant les traitements au sulfate en présence de lumière ne permet qu'une protection partielle. À partir d'une certaine concentration en sulfate ( $\geq 10$  mM) des dommages structurels apparents sont observés au niveau du complexe d'émission d'oxygène.
- v. Les valeurs de désactivation thermique des membranes traitées au sulfate nous montrent aussi que le mode de désexcitation des pigments était perturbé. Une grande quantité de l'énergie absorbée n'atteint pas les centres réactionnels.
- vi. Le sulfate influence aussi l'organisation des caroténoïdes.

## 2. Concernant l'effet du sulfite :

Le traitement au sulfite des membranes nous a fourni des informations sur la nature du lien entre le polypeptide de 33 kDa et le complexe du PSII (présence de force électrostatique et de ponts hydrogène).

Il serait intéressant de poursuivre cette recherche en regard des développements récents concernant la modélisation mathématique de la fluorescence (84-86). Nous pourrions ainsi en apprendre davantage sur le sort réservé à l'énergie d'excitation puisque des changements dans les fonctions photosynthétiques peuvent se refléter dans la cinétique de fluorescence variable.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Madamanchi, N.R., Donahue, J.L., Cramer, C.L., Alscher, R.G., Pedersen, K. (1994) "Differential response of Cu, Zn superoxide dismutases in two pea cultivars during a short-term exposure to sulfur dioxide.". *Plant Molecular Biology* 26: 95-103
2. Malhotra, S. S., Khan, A. A. (1983) "Sensitivity to SO<sub>2</sub> of various metabolic processes in an epiphytic lichen *Enervia mesomorpha*". *Biochem. Physiol. Pflanzen* 178, 121
3. Veeranjanyulu, K., Charlebois, D., N'soukpoé-Kossi, C.N., Leblanc, R.M. (1992) "Sulfite inhibition of photochemical activity of intact pea leaves.", *Photosynthesis Research* 34: 271-278
4. Ranieri, A., Pieruccetti, F., Panicucci, A., Castagna, A., Lorenzini, G., Soldatini, G. F. (1999) "SO<sub>2</sub>-induced decrease in photosynthetic activity in two barley cultivars. Evidence against specific damage at the protein-pigment complex level.", *Plant Physiol. Biochem.* 37 : 919-929
5. Veljovic-Jovanovic, S., Bilger, W., Heber, U. (1993) "Inhibition of photosynthesis, acidification and stimulation of zeaxanthin formation in leaves by sulfur dioxide and reversal of these effects.", *Planta* 191 : 365-376
6. Daniell, H. et Sarojini, G. (1981) "On the possible site of sulfite action in the photosynthetic electron transport chain and light modulation of enzyme activity.", *Photobiochem. Photobiophys.* 2, 61-68
7. Shimazaki, K., Sugahara, K. (1980) "Inhibition site of the electron transport system in lettuce chloroplasts by fumigation with SO<sub>2</sub>". *Plant Cell Physiol.* 21, 125-135
8. Shimazaki, K., Ito, K., Kondo, N., Sugahara, K. (1984) "Reversible inhibition of the photosynthetic water-splitting enzyme by SO<sub>2</sub> fumigation assayed by chlorophyll fluorescence and EPR signal in vivo.", *Plant Cell Physiol.* 25, 795-803
9. Sylvius, J.E., Ingle, M., Baer, C.H. (1975) "Sulfur dioxide inhibition of photosynthesis in isolated chloroplasts.", *Plant. Physiol.* 56 : 434-437
10. Alscher, R., Bower, J.L., Zipfel, W. (1987) "The basis for different sensitivities of photosynthesis to SO<sub>2</sub> in two cultivars of pea.", *J. Exp. Bot.* 38: 99-108
11. Marques, I.A., Anderson, L.E. (1986) "Effects of Arsenite, Sulfite, and Sulfate on photosynthetic carbon metabolism in isolated Pea chloroplasts.", *Plant Physiol.* 82, 488-493
12. Darrall, N.M., (1989) "The effect of air pollutants on physiological processes in plants.". *Plant Cell Environ.* 12: 1-30

13. Rennenberg, H. (1984) "The fate of excess sulfur in higher plants.", *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35 : 121-153
14. Gregory, R.P.F. (1989) "Biochemistry of photosynthesis.", John Wiley & Son, 257 pages
15. Prat, R., Vonarx. V. (1999) "La structure du chloroplaste.",  
<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Chloroplaste/met.htm>
16. Coste, C. (1978) "Photosynthèse et production végétale.", Bordas, Paris, 371 pages
17. Foyer, Christine H. (1984) . "Photosynthesis.", John Wiley & Son, 219 pages
18. Daniel, A. (2001) "Biogéol : les Sciences de la Vie et de la Terre (SVT) au lycée.",  
[http://biogeol.free.fr/Lexique/Def\\_C.htm](http://biogeol.free.fr/Lexique/Def_C.htm)
19. Hooper, J. Kenneth (1984) "Chloroplast.", Plenum Press, 280 pages
20. Velthuys, B.R. (1987) "The photosystem two reaction center.", ed. J. Barber, 341-377
21. Hansson, Ö., Wydrzyski, T. (1990) "Current perception of photosystem II.", *Photosynthesis Research.* 23 : 131-162
22. Morrissey, P.J., McCauley, S.W., Melis, A. (1986) "Differential detergent-solubilization of integral thylakoid membrane complexes in spinach chloroplasts.", *Eur. J. Biochem.* 160 : 389-393
23. Barber, J. (24 juillet 2003) "Photosystems I+II.",  
<http://www.bio.ic.ac.uk/research/barber/index.html>
24. Andréasson, L.-E., Vanngard, T. (1988) "Electron transport in photosystem I and II.", *Ann. Rev. Plant Physiol.* 39 : 379-411
25. Barber, J. (1987) "The biochemistry of plants.", ed. Hatch, M.D. et Boardman N.K., Academic Press. Inc, 422 pages
26. Barber, J. (1998) "Photosystem two.", *Biochim. et Biophys. Acta*, 1365 : 269-277
27. Govindjee, Coleman, W. (1990) "La production d'oxygène par les plantes. », *Pour la Science*, 150 : 42-49
28. Frackowiak, D., Hotchandani, S., Leblanc, R.M. (1983) "Effect of electric field on polarized absorption spectra of chlorophyll a and b in nematic liquid crystal.", *Photobiochem. Photobiophys.* 6 : 339-350

29. Renger, G. (1987) "Biological exploitation of solar energy by photosynthetic water splitting.", *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 26 :643-660
30. Govindjee, Coleman, W.J. (1985) "The electron donor side of photosystem II : the oxygen evolving complex.", *Photochem. Photobiol.* 42 : 187-210
31. Barber, J., Morris, E., Büchel, C. (2000) "Revealing the structure of the photosystem II chlorophyll binding proteins. CP43 and CP47.", *Biochim. Biophys. Acta.* 1459 : 239-247
32. Wang, J., Shan, J., Xu, Q., Ruan, X., Gong, Y., Kuang, T. (1999) "Light-and-heat-induced denaturation of Photosystem II core-antenna complexes CP43 and CP-47", *J. Photochem. Photobiol. B : Biol.* 50 : 189-196
33. Seibert, M., Picorel, R., Rubin, A.B., Connolly, J.S. (1988) "Spectral, photophysical, and stability properties of isolated photosystem II reaction center", *Plant Physiol.* 87 : 303-306
34. Trebst, A. (1986) "The topology of plastoquinone and herbicide binding peptides of photosystem II in the thylakoid membrane.", *Z. Naturforsch 41c* :240-245
35. Wollman, F.-A., Minai, L., Nechushtai, R. (1999) "The biogenesis and assembly of photosynthetic proteins in thylakoid membranes.", *Biochim. Biophys. Acta* 1411 : 21-85
36. Nanba, O. et Satoh, K. (1987) "Isolation of a photosystem II reaction center consisting of D-1 and D-2 polypeptides and cytochrome b-559.", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84 : 109-112
37. Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R., Michel H. (1985) "Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction center *Rhodospseudomonas viridis* at 3 Å resolution.", *Nature*, 318 : 618-624
38. Heathcote, P., Fyfe, Paul K., Jones, Michael, R. (2002) "Reaction centres: the structure and evolution of biological solar power.", *Trends in Biochemical Sciences* 27 : 79-87
39. Ikeuchi, M., Inoue, Y. (1988) "A new photosystem II reaction center component (4.8 kDa protein) encoded by chloroplast genome.", *FEBS Lett.* 241 :99-104
40. Webber, A.N. et al. (1989) "A fifth chloroplast-encoded polypeptide is present in the photosystem II reaction center complex.", *FEBS Lett.* 242: 259-262
41. Andersson, B. et Akerlund, H.-E. (1987) "The light reactions.", ed. J. Barber, pp. 279-420
42. Franzen, L.-G., Andersson, L.-E. (1984) "Studies of manganese binding by selective solubilization of photosystem II polypeptides.", *Biochim. Biophys. Acta.* 765 : 166-170
43. Rutherford, A.W. (1989) "Photosystem II, the water-splitting enzyme.", *TIBS.* 14 : 227-232

44. Rutherford, A.W., Faller, P. (2001) "The heart of photosynthesis in glorious 3D.", *Trends in Biochem. Sc.* 26: 341-344
45. Homann, P.H. (1987) "The relations between the chloride, calcium, and polypeptide requirements of photosynthetic water oxidation.", *J. of Bioenergetics and Biomembranes*, 125-132
46. Murphy, D.J. (1986) "The molecular organisation of the photosynthetic membranes of higher plants.", *Biochim. and Biophys. Acta.* 864 : 33-94
47. Nield, J., Orlava, Elena, V., Morris, Edward, P., Gowen, B., Marin van Heel, Barber, J. (2000) "3D ap of the plant photosystem II supercomplex obtained by cryoelectron microscopy and single particle analysis.", *Nature Structural Biology*, 7 : 44-47
48. Bassi, R., Rigoni, F., Giacometti, G.M. (1990) «Chlorophyll binding proteins with antenna function in higher plants and green algae.", *Photochem. Photobiol.* 51 : 1187-1206
49. Ford, R.C., Stoylova, S.S., Holzenburg, A. (2002) "An alternative model for photosystem II/light harvesting complex II in grana membranes based on cryo-electron microscopy studies.", *Eur. J. Biochem.* 269 : 326-336
50. Weerd, F.L. de. Stokklum, H.M. van, Amerongen, H. van, Dekker, J.P., Grondelle, R. van, (2002) "Pathways for energy transfert in the core light-harvesting complexes CP43 and CP47 of photosystem II.", *Biophy. Journal*, 82 : 1586-1597
51. Shan, J., Wang, J., Li, L., Zhao, N., Kuang, T. (2000) "The excitation energy transfer between  $\beta$ -car and Chla molecules in PSII core antenna complexes CP43 and CP47.", *Chinese Science Bulletin* 45 : 1579-1583
52. Frank, H.A., Cogdell, R.J. (1993) "Carotenoids in photosynthesis.", eds. Young, A., Britton, G. 252-236
53. Staehelin, L.A., Arntzen, C.J. (1983) "Regulation of chloroplast membrane function.", *J. of Cell Biol.*, 97 :1327-1337
54. Leegood, R.C. et Walker, D.A.(1983) "Isolation of membrane and organelles from plants cells.", ed. J.L. Hall et A.L. Moore, Academic Press
55. Beauregard, M. et Popovic, R. (1988) "Sulfate effect on PSII complex.", *J. Plant Physiol.* Vol. 133: 615
56. Arnon, D.I. (1949) "Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*", *Plant Physiol.*, 24: 1-15
57. Delieu, T. et Walker, D.A. (1972) "An improved cathode for the measurement of photosynthetic oxygen evolution by isolated chloroplasts.", *New Phytol.* 71: 201-225



58. Hames, B.D. (1981) "Gel electrophoresis of proteins.", ed. Hames, B.D. et Rickwood, D. IRL Press, 283 pages
59. Fiksinski, K., Frackowiak, D. (1980) "Comparison of various films used in biophysical investigations as anisotropic matrices.", *Spectroscopy Lett.* 13(12) : 873-889
60. Frackowiak, D., Hotchandani, S., Leblanc, R.M. (1986) "Polarized photoacoustic spectroscopy of oriented system.", *Acta Phys. Polon.*, A69: 121-133
61. Wrobel, D., Hendrich, W. (1989) "Thermal deactivation and energy transfert in isolated photosystem 2 and light-harvesting complexes in polyvinylalcohol film.", *J. Photochem. Photobiol.*, B3(3): 319-332
62. Frackowiak, D. et coll. (1987) "Polarized spectra of photosystem 2 particles in isotropic and stretched polyvinylalcohol film.", *Photosynthetica* 21(2) : 147-155
63. Rosencraig, A. (1980) "Photoacoustics and photoacoustic spectroscopy.", ed. Jonh Wiley & Son, 309 pages
64. Murata, N., Miyao, M., et Kuwabara, T. (1983) "The oxygen evolving system of photosynthesis.", ed. Inoue, Y. et al., Academic Press, Tokyo. pp. 213-222
65. Kuwabara, T., et Murata, N. (1983) "Quantitative analysis of the inactivation of photosynthetic oxygen evolution and the release of polypeptides and manganese in the photosystem II particles of spinach chloroplasts.", *Plant Cell Physiol.* 24. 741-747
66. Kuwabara, T., Miyao, M., Murata, N. (1985) "The function of 33-kDa protein of the photosynthetic oxygen-evolution system studied by reconstitution experiments.", *Biochim. Biophys. Acta* 806, 283-289
67. Ono, T., Inoue, Y. (1987) "Mn-preserving extraction of 33-, 24- and 16-kDa proteins from O<sub>2</sub>-evolving PSII particles by divalent salt-washing.", *FEBS Lett.* 164. 255-260
68. Ono, T., Inoue, Y. (1983) "Mn-preserving of 33-, 24- and 16-kDa proteins from O<sub>2</sub>-evolving PS II particles by divalent salt-washing.", *FEBS Letter.* 164 : 255-260
69. Völker, M., Ono, T., Inoue, Y., Renger, G. (1985) "Effect of trypsin on PSII particles. Correlation between Hill activity, Mn-a peptide pattern.", *Biochim. Biophys. Acta* 806, 25-34
70. Beauregard, M., Morin, L., et Popovic, R. (1987) "Sulfate Inhibition of photosystem II Oxygen evolving complex.", *Applied Biochem. and Biotech.* 16 : 109-117
71. Schmidt, W., Neubauer, C., Kolbowski, J., Schreiber, U., Urbach, W. (1990) "Comparison of effects of air pollutants (SO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>) on intact leaves by measurements of chlorophyll fluorescence and P700 absorbance changes.", *Photosynthesis Research* 25: 241-248

72. Sandusky, P.O. et Yocum, C.F. (1986) "The chloride requirement for photosynthetic oxygen evolution – factors affecting nucleophilic displacement of chloride from the oxygen-evolving complex.", *Biochim. Biophys. Acta* 849: 85-93
73. Homann, P.H. (1986) "The relation between the chloride status of the photosynthetic water splitting complex and the inhibitory effectiveness of amine.", *Photosynth. Res.* 410, 497-503
74. Kuwabara, T., Murata, N. (1982). "Inactivation of photosynthetic O<sub>2</sub> evolution with concomitant release of the three polypeptides in the photosystem II particles of spinach chloroplasts." *Plant. Cell Physiol.* 23 : 533-539
75. Critchley, C. (1985) "The role of chloride in photosystem II.", *Biochim. Biophys. Acta* 811, 33-46
76. Ghanotakis, D.F., Babcock, G.T. et Yocum, C.F. (1985) "On the role of water-soluble polypeptides (17, 23 kDa), calcium and chloride in photosynthetic oxygen evolution.", *FEBS Lett.* 192, 1-3
77. Miyao, M. et Murata, N. (1984) "Calcium ions can be substituted for the 24-kDa polypeptide in photosynthetic oxygen evolving complex.", *FEBS. Lett.* 168 : 118-120
78. Imaoka, A., Akabori, K., Yanagi, M., Izumi, K., Toyoshima, Y., Kawamori, A., Nakayama, H., Sato, J. (1986) "Roles of three lumen-surface proteins in the formation of S<sub>2</sub> state and O<sub>2</sub> evolution in Photosystem II particles from spinach thylakoid membranes.", *Biochem. Biophys. Acta* 848 : 201-211
79. Shimazaki, K., Nakamachi, K., Kondo, N., Sugahara, K. (1984) "Sulfite inhibition of photosystem II in illuminated spinach leaves. ". *Plant Cell Physiol.* 25: 337-341
80. Shimasaki, K., Ito, K., Sugahara, K. (1984) "Reversible inhibition of the photosynthetic water-splitting enzyme system by SO<sub>2</sub> fumigation assayed by chlorophyll fluorescence and EPR signal in vivo.", *Plant Cell Physiol.* 25: 795-803
81. Okumura, A., Ohta, H., Inoue, Y., Enami, I. (2001) "Identification of functional domains of the extrinsic 12 kDa Protein in red algal PSII by limited proteolysis and directed mutagenesis.", *Plant Cell Physiology* 42: 1331-1337
82. Ikeuchi, M. et Inoue, Y. (1986) "Characterization of O<sub>2</sub> evolution by a wheat photosystem II reaction center complex isolated by a simplified method : disjunction of secondary acceptor quinone and enhanced Ca<sup>2+</sup> demand.", *Arch. Biochem. Biophys.* 247: 97-107
83. Lorrain, L., Frackowiak, D., Romanowski, M., Leblanc, R. (1987) "Effect of stretching of chloroplasts and thylacoids embedded in polymers films.", *Photosynthetica* 21 : 43-50

84. Lazar, D., Naus, J., Matouskova, M., Flasarova, M. (1997) "Mathematical modeling of changes in chlorophyll fluorescence induction caused by herbicides.", *Pestic. Biochem. Physiol.* 57, 200-210
85. Lazar, D. (1999) "Chlorophyll a fluorescence induction.", *Biochim. Biophys. Acta* 1412, 1-28
86. Stirbert, A, Govindjee, Strasser, B.J., Strasser, R.J. (1998) "Chlorophyll a fluorescence induction in higher plants: Modelling and numerical simulation.", *J. Theor. Biol.* 193 : 131-151